VOLUMEN 12 ABRIL-JUNIO 1959 NUMERO 2

Microbiología Española

publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

UNSW
RAIN
COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1960

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

SUMARIO

Páginas

Ensayos experimentales sobre la formación de anticuerpos fijadores del complemento del virus vacunal, según las vías de inoculación utilizadas, por *Eduardo Gallardo* y *María del Rosario de Zuazo* 87

Estudio de un nuevo virus encontrado en *Petunia hybrida*, por *M. Rubio* y *M. Rosell* 105

Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación.— III. Influencia de los alcoholes en la fermentación en superficie, por *José Luis Malo Echevarría* y *Benito Regueiro Varela* 139

Los blastomicetos en las sidras de Asturias, por *B. Iñigo* y *D. Vázquez* 161

Sobre un nuevo método de tinción de bacilos esporulados, por *F. Fernández Sánchez* 187

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

ENSAYOS EXPERIMENTALES SOBRE LA FORMACION DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO DEL VIRUS VACUNAL, SEGUN LAS VIAS DE INOCULACION UTILIZADAS

POR

EDUARDO GALLARDO y MARÍA DEL ROSARIO DE ZUAZO

Habiéndose ocupado uno de nosotros, en un trabajo de tesis, de la obtención de antígenos para la determinación de la persistencia, plenitud e iniciación de los anticuerpos fijadores del complemento, demostrables en los sueros de los conejos inoculados con virus vacunal, nos pareció interesante, para completar el estudio, investigar la influencia de la vía de inoculación en la formación de estos anticuerpos específicos.

Las vías de inoculación elegidas fueron las siguientes: 1.ª Cutánea (escarificación, 1); 2.ª Intracutánea (punturas, 2); 3.ª Intramuscular; 4.ª Intraperitoneal; 5.ª Intratesticular; 6.ª Intravenosa.

El material utilizado para las inoculaciones fué pulpa vacunal de ternera muy activa, a la concentración de 1 × 10 y bacteriológicamente estéril, por adición de penicilina y estreptomicina en la siguiente proporción: 50 unidades de penicilina y 50 mgs. de estreptomicina por cada c. c. de suspensión.

La cantidad inoculada en cada caso fue de 0,20 c. c. de la suspensión.

A los cuatro y a los doce días de la inoculación se sangraron los conejos por puntura cardíaca; los sueros, separados con las máximas precauciones asépticas, fueron inactivados a 56° C. durante media hora, y una vez añadido Merfen, repartidos en ampollas para su liofilización y almacenamiento posterior en helera a —18° C. En el momento de ser utilizados los sueros, fueron nuevamente inactivados durante media hora, a 65° C., previa dilución al 1 × 2,5.

Los conejos inoculados por *vía cutánea* presentaban, a los cinco días, pústulas confluentes en la zona escarificada y reacción inflamatoria, que cedió a los ocho días, coincidiendo con el comienzo de la desecación de las pústulas. Por esta vía obtuvimos cuatro sueros: 1.ª y 2.ª sangría del conejo núm. 1 y 1.ª y 2.ª sangría del conejo núm. 7. Los dos primeros, de cuatro y doce días, respectivamente, se liofilizaron, y los otros dos, también de cuatro y doce días, se titularon sin someterlos a liofilización.

Por *vía intracutánea* se obtuvieron cuatro sueros: del conejo núm. 2, que presentó una lesión de 22 mm. con una necrosis de 9 mm., las sangrías 1.ª y 2.ª de cuatro y doce días, que se liofilizaron, y del conejo núm. 8, que presentó una lesión de 26 mm. con 11 mm. de necrosis, las sangrías 1.ª y 2.ª, también de cuatro y doce días, pero sin liofilizar.

Por *vía intramuscular* se obtuvieron otros cuatro sueros: del conejo núm. 3, 1.ª y 2.ª sangría de cuatro y doce días, liofilizados, y del conejo núm. 9, 1.ª y 2.ª sangría, también de cuatro y doce días, sin liofilizar.

Otros cuatro sueros se obtuvieron por *vía intraperitoneal*: la 1.ª y 2.ª sangría del conejo núm. 4, de cuatro y doce días, liofilizados, y del conejo núm. 10, 1.ª y 2.ª sangría, también de cuatro y doce días, sin liofilizar.

La orquitis vacunal se presentó en los conejos inoculados por *vía intratesticular*, a los tres días de su inoculación. Obtuvimos los sueros 1.ª y 2.ª sangría del conejo núm. 5, de cuatro y doce días, liofilizados, y del conejo núm. 11, la 1.ª y 2.ª sangría, de cuatro y doce días, sin liofilizar.

Y por último, del conejo núm. 6, la 1.ª y 2.ª sangría, de cuatro y doce días, liofilizados, y del conejo núm. 12, la 1.ª y 2.ª sangría, también de cuatro y doce días, sin liofilizar. Estos conejos fueron inoculados por *vía intravenosa*.

Para la titulación de los sueros obtenidos empleamos los antígenos de embriones de pollo, de membranas alantoideas y de pulpa vacunal de ternera (3).

Los dos primeros fueron obtenidos inoculando un lote de huevos de gallina de diez a doce días de incubación (técnica de Cox, 4) con 0,25 c. c. de un filtrado de pulpa dérmica de ternera (técnica de Monteiro y Godinho, 5), y otro lote de huevos de los mismos días de incubación, con 0,20 c. c. de la suspensión de pulpa vacunal de ternera al 1×10,

bacteriológicamente estéril. Todos los huevos cuyos embriones aparecieron muertos de los tres a los seis días de su inoculación, presentaron, al ser abiertos, una gran lesión de forma pustulosa en la puntura de la corioalantoides de la cámara de aire (6).

El antígeno de pulpa vacunal de ternera se preparó partiendo de la misma pulpa que utilizamos para las inoculaciones en conejo.

Para la titulación de cada uno de los sueros, utilizamos la pauta seguida en nuestro trabajo anterior. En una serie de ocho tubos colocamos diluciones de suero al 1/2,5, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/100 y 1/120 en un volumen de 0,20 c. c. por cada dilución; añadimos a cada tubo 0,20 c. c. de complemento diluído, de modo que cada décima contenga una unidad complementaria, y 0,20 c. c. del antígeno diluído al título. Agitadas las gradillas se colocan en nevera, a temperatura de 4° C., para su incubación durante dieciséis a dieciocho horas. Transcurridas éstas, se incuba nuevamente el contenido de los tubos durante media hora, en baño María, a 37° C., después de haber añadido a cada tubo 0,40 c. c. del sistema hemolítico preparado quince minutos antes. Los resultados son anotados con los números 4, 3, 2, 1, 0 y ±, considerando como título de suero el que dé dos o más de fijación con la dilución más alta.

Los posibles errores se evitan practicando la reacción con toda clase de testigos, y para ello pusimos siempre controles de suero problema y de cada uno de los antígenos utilizados.

TITULACION DE LOS SUEROS *LIOFILIZADOS*

CONEJO NÚM. 1.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación cutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	2	1	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	3	2	1	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0

CONEJO NÚM. 1.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación cutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	4	4	4	3	2	0	0
— alantoides " al 1/3	4	4	4	4	4	2	1	0
— embrión pulpa, al 1/3	4	4	4	3	2	1	0	0
— alantoides " al 1/4	4	4	4	4	3	2	1	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	4	4	2	2	0	0	0

CONEJO NÚM. 2.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intracutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	2	1	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	3	2	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	3	2	1	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0

CONEJO NÚM. 2.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intracutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	4	4	4	3	2	±	0
— alantoides " al 1/3	4	4	4	4	4	3	2	0
— embrión pulpa, al 1/3	4	4	4	3	2	1	0	0
— alantoides " al 1/4	4	4	4	4	3	2	1	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	4	4	4	3	2	0	0

CONEJO NÚM. 3.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intramuscular.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	2	1	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	2	2	±	0	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	2	±	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	2	2	1	0	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	1	0	0	0	0	0	0	0

CONEJO NÚM. 3.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intramuscular.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	3	3	2	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	4	4	3	3	2	1	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	3	2	1	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	4	4	3	3	2	1	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	3	2	2	0	0	0	0

Conejo núm. 4.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intraperitoneal.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	2	1	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	2	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	2	1	0	0	0	0	0	0

Conejo núm. 4.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intraperitoneal.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	3	3	2	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	4	3	3	2	2	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	3	2	2	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	4	3	3	2	2	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	3	2	2	0	0	0	0

Conejo núm. 5.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intratesticular.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	2	1	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	2	2	0	0	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	2	0	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	2	2	0	0	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	1	0	0	0	0	0	0	0

CONEJO NÚM. 5.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intratesticular.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	3	2	2	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	4	3	3	2	2	±	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	4	3	3	2	2	0	0	0
— alantoides " al 1/4	4	3	3	2	2	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	3	2	2	0	0	0	0

CONEJO NÚM. 6.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intravenosa.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	2	±	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	3	2	0	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	2	1	0	0	0	0	0	0

CONEJO NÚM. 6.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intravenosa.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	4	4	3	2	1	±	0
— alantoides " al 1/3	4	4	4	4	3	2	1	±
— embrión pulpa, al 1/3	4	4	3	2	2	±	0	0
— alantoides " al 1/4	4	4	4	4	3	2	1	±
— pulpa vacunal al 1/4	4	3	3	2	2	±	0	0

TITULACION DE LOS SUEROS *SIN LIOFILIZAR*

CONEJO NÚM. 7.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación cutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	3	2	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	3	2	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	3	2	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	3	3	2	±	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	3	2	±	0	0	0	0

CONEJO NÚM. 7.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación cutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	4	4	3	2	1	0	0
— alantoides " al 1/3	4	4	4	3	3	2	1	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	4	3	2	2	0	0	0

CONEJO NÚM. 8.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intracutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	3	2	1	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	3	2	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	2	2	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	4	3	3	2	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	3	2	1	0	0	0	0

Conejo núm. 8.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intracutánea.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	4	4	3	2	1	0	0
— alantoides " al 1/3	4	4	4	3	3	2	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	4	3	2	2	0	0	0

Conejo núm. 9.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intramuscular.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	2	±	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	3	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	3	2	1	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0

Conejo núm. 9.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intramuscular.*

Diluciones del suero	1,2/5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	4	3	2	1	0	0	0
— alantoides " al 1/3	4	3	3	2	2	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	3	2	1	0	0	0	0

Conejo núm. 10.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intraperitoneal*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	1	0	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	2	1	0	0	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	1	0	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	2	2	±	0	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	1	0	0	0	0	0	0	0

Conejo núm. 10.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intraperitoneal.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	3	2	2	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	4	3	3	2	1	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	3	2	2	0	0	0	0

Conejo núm. 11.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intratesticular*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	2	2	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	2	1	0	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	2	1	0	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	2	2	0	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	2	1	0	0	0	0	0	0

Conejo núm. 11.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intratesticular.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	3	3	2	1	0	0	0
— alantoides " al 1/3	4	4	3	3	3	1	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	3	3	2	0	0	0	0

Conejo núm. 12.—Primera sangría, a los cuatro días de la *inoculación intravenosa.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	3	3	2	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/3	3	3	2	1	0	0	0	0
— embrión pulpa, al 1/3	3	2	1	0	0	0	0	0
— alantoides " al 1/4	3	3	2	0	0	0	0	0
— pulpa vacunal al 1/4	3	2	1	0	0	0	0	0

Conejo núm. 12.—Segunda sangría, a los doce días de la *inoculación intravenosa.*

Diluciones del suero	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/120
Antígeno embrión filtrado, al 1/4	4	4	4	3	2	1	0	0
— alantoides " al 1/3	4	4	4	3	3	2	1	0
— pulpa vacunal al 1/4	4	4	4	3	2	±	0	0

CUADRO 1

Resultados obtenidos con los sueros de cuatro días liofilizados.

Antígenos	Embrión filtrado al 1/4	Alantoides filtrado al 1/3	Embrión pulpa al 1/3	Alantoides pulpa al 1/4	Pulpa vacunal al 1/4
CONEJO NÚM. 1.					
Inoculación cutánea. Primera sangría	Título: 1/5	Título: 1/10	Título: 1/5	Título: 1/10	Título: 1/5
CONEJO NÚM. 2.					
Inoculación intracutánea. Primera sangría	— 1/5	— 1/10	— 1/10	— 1/10	— 1/5
CONEJO NÚM. 3.					
Inoculación intramuscular. Primera sangría	— 1/2,5	— 1/5	— 1/2,5	— 1/5	— 0
CONEJO NÚM. 4.					
Inoculación intraperitoneal. Primera sangría	— 1/5	— 1/10	— 1/5	— 1/5	— 1/2,5
CONEJO NÚM. 5.					
Inoculación intratesticular. Primera sangría	— 1/2,5	— 1/5	— 1/2,5	— 1/5	— 0
CONEJO NÚM. 6.					
Inoculación intravenosa. Primera sangría	— 1/5	— 1/10	— 1/5	— 1/10	— 1/2,5

CUADRO 2

Resultados obtenidos con los sueros de doce días liofilizados.

Antígenos	Embrión filtrado al 1/4	Alantoides filtrado al 1/3	Embrión pulpa al 1/3	Alantoides pulpa al 1/4	Pulpa vacunal al 1/4
CONEJO NÚM. 1.					
Inoculación cutánea. Segunda sangría	Título: 1/80	Título: 1/80	Título: 1/40	Título: 1/80	Título: 1/40
CONEJO NÚM. 2.					
Inoculación intracutánea. Segunda sangría	— 1/80	— 1/100	— 1/40	— 1/80	— 1/80
CONEJO NÚM. 3.					
Inoculación intramuscular. Segunda sangría	— 1/20	— 1/40	— 1/10	— 1/40	— 1/20
CONEJO NÚM. 4.					
Inoculación intraperitoneal. Segunda sangría	— 1/20	— 1/40	— 1/20	— 1/40	— 1/20
CONEJO NÚM. 5.					
Inoculación intratesticular. Segunda sangría	— 1/20	— 1/40	— 1/40	— 1/40	— 1/20
CONEJO NÚM. 6.					
Inoculación intravenosa. Segunda sangría	— 1/40	— 1/80	— 1/40	— 1/80	— 1/40

CUADRO 3

Resultados obtenidos con los sueros de cuatro días sin liofilizar.

Antígenos	Embrión filtrado al 1/4	Alantoides filtrado al 1/3	Embrión pulpa al 1/3	Alantoides pulpa al 1/4	Pulpa vacunal al 1/4
CONEJO NÚM. 7.					
Inoculación cutánea. Primera sangría	Título: 1/10	Título: 1/20	Título: 1/10	Título: 1/20	Título: 1/10
CONEJO NÚM. 8.					
Inoculación intracutánea. Primera sangría	— 1/10	— 1/20	— 1/10	— 1/20	— 1/10
CONEJO NÚM. 9.					
Inoculación intramuscular. Primera sangría	— 1/5	— 1/10	— 1/5	— 1/10	— 1/5
CONEJO NÚM. 10.					
Inoculación intraperitoneal. Primera sangría	— 0	— 1/2,5	— 0	— 1/2,5	— 0
CONEJO NÚM. 11.					
Inoculación intratesticular. Primera sangría	— 1/5	— 1/5	— 1/2,5	— 1/10	— 1/2,5
CONEJO NÚM. 12.					
Inoculación intravenosa. Primera sangría	— 1/10	— 1/10	— 1/5	— 1/10	— 1/5

CUADRO 4

Resultados obtenidos con los sueros de doce días sin liofilizar.

Antígenos	Embrión filtrado al 1/4	Alantoides filtrado al 1/3	Pulpa vacunal al 1/4
Conejo núm. 7.			
Inoculación cutánea. Segunda sangría	Título: 1/40	Título: 1/80	Título: 1/40
Conejo núm. 8.			
Inoculación intracutánea. Segunda sangría	— 1/40	— 1/80	— 1/40
Conejo núm. 9.			
Inoculación intramuscular. Segunda sangría	— 1/20	— 1/40	— 1/10
Conejo núm. 10.			
Inoculación intraperitoneal. Segunda sangría	— 1/20	— 1/20	— 1/20
Conejo núm. 11.			
Inoculación intratesticular. Segunda sangría	— 1/20	— 1/40	— 1/20
Conejo núm. 12.			
Inoculación intravenosa. Segunda sangría	— 1/40	— 1/80	— 1/40

Del estudio de estos cuadros se deduce, que los sueros que han alcanzado más alto título han sido los núms. 1 y 7, 2.ª sangría correspondientes a conejos inoculados por vía cutánea; los núms. 6 y 12, 2.ª sangría, obtenidos de conejos inoculados por vía intravenosa y los sueros números 2 y 8, 2.ª sangría, de conejos inoculados intracutáneamente, siendo de todos ellos el núm. 2, 2.ª sangría, el que dió título más alto. Las fijaciones practicadas con los sueros de los conejos sangrados a los cuatro días de su inoculación dieron títulos muchos más bajos, sin que en ningún caso su título fuese superior al 1/20.

Las otras vías de inoculación, intramuscular, intraperitoneal e intra-

testicular, dan lugar a sueros de títulos bastante aceptables, sin ninguna diferencia apreciable entre ellas, ya que las que se observan entre los títulos alcanzados por cada suero se deben a la sensibilidad de los antígenos, que es más acentuada en el de membranas alantoideas, lo que confirma el trabajo de tesis anteriormente citado.

Hemos podido observar también que la liofilización no influye en el título del suero, ya que estudiando los obtenidos por vía intracutánea vemos, que si bien el suero liofilizado núm. 2, 2.ª sangría (cuadro 2), alcanza títulos más elevados que los del suero núm. 8, 2.ª sangría (cuadro 4), obtenido en las mismas condiciones, pero sin liofilizar, lo que podría indicar un aumento de título debido a la liofilización, el suero núm. 2, 1.ª sangría (cuadro 1), liofilizado, da por el contrario unos títulos ligeramente más bajos que los de su correspondiente suero sin liofilizar, el núm. 8, 1.ª sangría (cuadro 3).

Habiendo preparado antígenos liofilizados en cantidad, para todas las pruebas, hemos podido comprobar que, al cabo de seis meses de almacenamiento en nevera, éstos adquirían poder anticomplementario, razón por la cual nosotros aconsejamos utilizar antígenos recientemente preparados.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la relación existente entre la formación de anticuerpos fijadores del complemento en los sueros de los conejos inoculados con virus vacunal y la vía de inoculación utilizada.

La titulación de los sueros obtenidos infectando los conejos por las distintas vías de inoculación, se hizo con los antígenos de alantoides, embrión de pollo y pulpa vacunal de ternera, resultando de estas titulaciones que los sueros que alcanzaron más alto título fueron los correspondientes a los conejos inoculados por vía cutánea, intravenosa e intracutánea, siendo esta última vía la que nos proporcionó el suero de más alto título.

SUMMARY

In this paper we study the relation existing between the formation of anti-bodies fixing the complement in serums of rabbits inoculated with vaccinal virus and the means of inoculation used.

The titulation of these serums obtained by infecting rabbits by different ways of inoculation, was fulfilled with the antigens of allantoids, chicken embryo and vaccinal pulp of calf and the result of these titulations was that the serums that attained the highest degree of titulation were those of rabbits inoculated by cutaneous, intravenous and intracutaneous way, the latter being the one of the highest titulation.

BIBLIOGRAFIA

(1) Calmette y Guerin. Ann. Inst. Pasteur, 15. 161, 1901.
(2) Grotii. Ergeb. Hyg. Bakt., 10. 335, 1929.
(3) Zuazo Aguirre. Microbiología Española, 11, 149, 1958.
(4) Cox. Science. 94. 339, 1941.
(5) Monteiro y Godinho. Mem. Inst. Butamtam, 5, 1930.
(6) Gallardo Martínez. Revista de Sanidad e Higiene Pública, 1952.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO DE UN NUEVO VIRUS ENCONTRADO EN *PETUNIA HYBRIDA* *

POR
M. RUBIO y M. ROSELL **

INTRODUCCION

Desde que Iwanowski, en 1892, consiguiera infectar plantas sanas de *Nicotiana tabaccum* con filtrados de savia de plantas enfermas de la enfermedad denominada por Mayer en 1886 "Mosaico", hasta nuestros días, se ha escrito y trabajado incansablemente sobre los virus de las plantas.

Fue también Iwanowski quien, en 1903, descubrió y describió las inclusiones, tanto cristalinas como amorfas, que se producen en las células de las plantas infectadas luego de los nueve días que siguen a la infección. Con esto quedó un campo abierto al estudio histopatológico de las virosis, ya que estas inclusiones son específicas para muchos de los virus y de gran valor diagnóstico.

Siete años más tarde, Lyon describe unas nuevas inclusiones en las células de las cañas de azúcar infectadas con la enfermedad de Fidji, producidas por un virus. Desde entonces hasta ahora han sido descritos unos treinta virus como productores de inclusiones intracelulares específicas.

En este trabajo se presenta un nuevo virus, como aportación a los ya descritos por varios investigadores en el mundo y en la Península Ibérica, y, casi con seguridad, un virus totalmente nuevo.

(*) M. Rosell ha podido efectuar este trabajo gracias a las becas otorgadas por el Patronato "Juan de la Cierva" durante los años 1956-1957-1958.

(**) Dirección actual: Cátedra de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Barcelona.

El virus que presentamos en este estudio muestra unas inclusiones celulares muy características, y que añaden uno más a la lista de virus que producen inclusiones intracelulares como síntoma interno específico y característico de su infección y desarrollo.

Localización del virus y síntomas externos observados in situ.

Nos llamó la atención la presencia en casi todas las plantas de *Petunia sp.*, situadas en un macizo de flores del jardín del Centro de Formación del Profesorado Laboral de Madrid, de unos síntomas que, por su aspecto, podían ser debidos a una enfermedad causada por virus.

Es una gran coincidencia que las plantas enfermas con el mismo aspecto fueran encontradas en los ribazos de la Residencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Pinar, 21), situada muy próxima al antedicho Centro (Pinar, 19). Haciendo averiguaciones hemos sabido que ambos jardines son cuidados por un mismo jardinero, y, por lo tanto, las plantas proceden de un mismo semillero; es decir, tienen un origen común.

Esto puede explicar, aunque no completamente, como ya veremos en la discusión, la localización tan limitada de estos síntomas. Durante nuestros estudios sobre este virus hemos tenido ocasión de viajar por algunos puntos de España y, como es natural, hemos observado atentamente cuantas plantas de *Petunia* se han presentado a nuestros ojos, sin volver a encontrar de nuevo estos síntomas mencionados, que nosotros hemos reproducido y conservado durante todo un año en nuestro invernadero, por infección sobre plantas sanas, con la savia de Petunias enfermas.

Hemos estado en Valencia y algunos de sus pueblos (Cullera y Sueca) y no encontramos planta alguna con estos síntomas. Igualmente, hemos estado en Barcelona y sus alrededores (Castelldefells, Sitges, etc.) e inútilmente hemos intentado hallarlos. En el mismo Madrid hemos observado otros jardines particulares o municipales (Retiro) y tampoco hemos encontrado plantas con este aspecto peculiar. De la misma forma, no han sido encontrados en nuestros viajes a Salamanca y provincia (Fregeneda, a 100 kms. de la capital).

Síntomas.

Las plantas, con la enfermedad muy avanzada, muestran cierto raquitismo y un amarilleamiento, generalmente muy extendido. Otras, las

que parecen más verdes y lozanas, presentan unos moteados amarillos fuertes, muy claros y precisos, que se destacan notablemente sobre el fondo verde intenso de la hoja. El número de manchas es variado (puede haber de 20 a 100 ó más), pero sobre todo se notan muy distintas y separadas unas de otras, aunque a veces son tan numerosas que casi enmascaran el color verde de la hoja.

En estas hojas, fuertemente moteadas, hemos encontrado inclusiones intracelulares.

La evolución de esta sintomatología es una ampliación del amarilleamiento que se extiende a todas las hojas que, finalmente, devienen cloróticas, pero no necróticas.

En las flores también se presentan síntomas llamativos. La flor de *Petunia* es actinomorfa, gamopétala, tuboloso-acampanada, con una gran expansión final que alcanza un tamaño de hasta unos 6-8 centímetros de diámetro, lo cual les da gran vistosidad. Pueden ser uniformemente coloreadas, con tonos que van desde el rojo púrpura, pasando por el rojo y rosa, hasta el blanco. (Fotos 1 y 2.) Algunas pueden presentar una combinación de los colores blanco y oscuro, dando flores estrelladas (probablemente debido a fenómenos genéticos).

Pues bien, en las flores con color, sea éste intenso o débil, de muchas de las plantas que presentaban síntomas de enfermedad en sus hojas (moteados y amarilleamientos), se presentaba también un llamativo moteado y estriamiento, rompimiento de color en pequeñas zonas, muy notorias en las flores de color intenso y menos en las de colores débiles, pero siempre patentes y manifiestos.

La cara posterior de estas flores presenta también unos síntomas característicos: superficie floral que aparece con una serie de pequeños círculos concéntricos, cuyas líneas están coloreadas y las interlíneas son más pálidas. Estos círculos llegan hasta la zona tubuliforme de la flor y pueden medir hasta dos milímetros de diámetro.

En todas estas flores se presentan con gran abundancia las inclusiones, tanto en las células epidérmicas como en los pelos o en las células del parénquima petaloideo, donde son muy numerosas.

Los síntomas apuntados anteriormente en las plantas de Petunia, nos hicieron sospechar que se trataba de una enfermedad producida por virus, y buscamos el método de comprobarlo.

El método seguro es la transmisión experimental a plantas sanas por

medio de la savia obtenida de las plantas enfermas y la observación, paso a paso, de la evolución de los síntomas comparándolos con los presentados por las plantas observadas inicialmente, así como la busca de plantas testigo que nos puedan caracterizar e identificar el virus.

PARTE EXPERIMENTAL

Material y métodos.

El invernadero.

Las plantas han sido cultivadas y mantenidas en un invernadero de unos seis metros de largo por tres de ancho, en el cual se han llevado a cabo las inoculaciones y transmisiones necesarias.

Se han cultivado las plantas de Petunia, tanto testigos como infectadas, como asimismo el resto de plantas testigo y diferenciales, que detallaremos más adelante, todas las cuales han desarrollado perfectamente, a pesar de que las condiciones del invernadero no son todo lo buenas que hubiera sido de desear, ya que hemos recogido oscilaciones diarias de temperatura de hasta 30° entre el mediodía y la noche, y no hemos podido impedir por completo la entrada de insectos, debido a que el invernadero, ni tiene acondicionamiento para la regulación de temperaturas ni está debidamente preparado para impedir el paso de los insectos.

Nos hemos defendido haciendo pulverizaciones y fumigaciones con insecticidas, y hemos de hacer constar aquí que no se ha presentado un hecho atribuíble a la transmisión o contaminación debida a los insectos.

Métodos ópticos.

Hemos trabajado con un microscopio óptico Zeiss-Winkel, binocular, con contraste de fase y dispositivo para fotografía, con el cual se han tomado la mayoría de las fotografías microscópicas que se presentan en el trabajo.

En la obtención de fotografías por impresión directa hemos seguido el método de uno de nosotros (M. Rubio Huertos), el cual da unos resultados excelentes, ya que es un fiel reflejo del aspecto de la hoja, mucho mejor que cualquier esquema o dibujo, y además tiene la ventaja de

quedar como archivo fiel para el posterior recuento de manchas y lesiones, o medida del tamaño de las mismas, si en el momento de recoger el material no se tiene tiempo para verificar estos datos.

Tinciones usadas en la caracterización de la inclusión.

Para poner de manifiesto y caracterizar las inclusiones, se han realizado diferentes tinciones, tanto de las llamadas vitales como de las que matan la célula durante la tinción.

Se han realizado las siguientes:

1. Biuret.
2. Feulgen.
3. Floxina.
4. Floxina con verde luz.
5. Mallory.
6. Millón.
7. Ninhidrina.
8. Sudán III.
9. Verde luz.
10. Xantoproteica.

que como se puede observar, en su mayoría son propias de sustancias proteicas.

Observaciones de las inclusiones al microscopio electrónico.

La obtención de las inclusiones, para hacer las preparaciones en los portaobjetos del microscopio electrónico, se ha hecho por el método de uno de nosotros (M. Rubio Huertos, 1953), tomando con una micropipeta las inclusiones de las células, las cuales previamente habían sido extraídas de las mismas por raspado de los arrancamientos epidérmicos de hojas y flores de Petunia infectada, controlando la operación por medio del microscopio óptico.

Una vez tomadas unas cuantas con la pipeta y comprobando que se encuentran en ella por medio del microscopio óptico, se depositan sobre la rejilla del portaobjetos del microscopio electrónico y se vuelve a comprobar con el primero si se han depositado en los espacios que forma la malla, y después se sombrean las preparaciones con oro-paladio.

Los trabajos realizados y electronografías presentadas han sido hechos en el microscopio electrónico R. C. A., modelo 1947, de 50 K. V., que posee el C. S. I. C. en el Instituto de Optica "Daza de Valdés". (*).

Hemos trabajado entre 5.000 y 7.000 aumentos, dadas las condiciones del referido microscopio, y algunas electronografías están ampliadas hasta 10.000 y 14.000 aumentos.

Plantas empleadas en los experimentos.

Todas las plantas que hemos usado durante las diversas experiencias, han sido obtenidas por nosotros en semilleros, partiendo de semillas sanas y habiendo vigilado todo su desarrollo.

Las especies ensayadas, así como el número de plantas que han sido inoculadas, son las que se indican en la relación siguiente:

ESPECIES	Núm de plantas
Beta vulgaris var Rapa (Remolacha)	6
Brassica chinensis	8
Capsicum annum (Pimiento)	8
Citrulus vulgaris (Melón de agua)	4
Cucurbita pepo (Calabaza)	4
Datura stramonium (Estramonio)	8
Phaseolus vulgaris (Habichuela común)	6
Solanum licopersicum (Tomate)	16
Solanum licopersicum var. K. red.	8
Vicia faba (Haba común)	8
Zinnia elegans	8
Nicotiana glutinosa	12
Nicotiana rústica	16
Nicotiana tabacum	64
Petunia sp.	128
Vigna sesquipedalis (Negrillas)	8
Vigna sinensis (Alubias de careta)	8
Total	320

(*) Damos las gracias al Dr. Fernando Catalina, Jefe de la Sección de Electrónica del mencionado Instituto, por la colaboración prestada.

Se observa que hacen un total de trescientas veinte plantas ensayadas y 17 especies o variedades distintas, a las que hemos de añadir otras 154 plantas de Petunia que dejamos sin inocular, para que sirvieran como testigo, para ver la transmisión por la semilla o la transmisión por los insectos.

Como es muy natural, las inoculaciones no fueron hechas todas a un tiempo, sino en épocas distintas, comprobando los resultados, que en algunos casos se han repetido tres y cuatro veces.

Para la obtención rápida de nuevas plántulas que pudieran ser inoculadas, sobre todo en las épocas frías de invierno, nos ha dado muy buen resultado el poner a germinar los semilleros en estufa de 25° C., hasta la salida de los jóvenes retoños, pasándolos al invernadero cuando han necesitado luz para su desarrollo.

RESULTADOS

Síntomas observados experimentalmente y sus características en las plantas.

Como se puede fácilmente observar por la relación precedente de plantas sometidas a ensayo, algunas de ellas son muy típicas, características y diferenciales para ciertos virus.

Beta vulgaris van. *Rapa.* Remolacha. Quenopodiáceas.

Sobre esta planta no se han obtenido síntomas manifiestos.

Brassica chinensis. Crucíferas.

No se obtuvieron síntomas, aunque también fueron inoculadas en dos épocas distintas.

Capsicum annum. (Pimiento). Solanáceas.

Esta solanácea no se mostró receptiva en ninguna de las dos veces en que se intentó la infección, sobre cuatro plantas cada vez.

Citrulus vulgaris. Melón de agua. Curcubitáceas.

No ha sido obtenido síntoma alguno manifiesto.

Cucurbita pepo. Calabaza. Cucurbitáceas.

Al igual que en la anterior cucurbitácea, no se obtuvo síntoma alguno en las dos inoculaciones llevadas a cabo.

Datura stramonium. Estramonio. Solanácea.

Esta es otra de las solanáceas ensayadas atentamente por ser característica o huésped diferencial para varios virus (especialmente para el "Tobacco Ring Spot"). Tampoco mostró síntomas específicos.

Nicotiana glutinosa. Solanácea.

Las diversas especies de *Nicotiana* son huéspedes diferenciales y muy característicos para determinados virus, y ésta es una de las más específicas para alguno de ellos, como en el caso del Mosaico del Tabaco.

Las inoculaciones que hemos hecho sobre estas plantas en tres ocasiones diferentes no han dado síntoma aparente.

Nicotiana rústica. Solanácea.

Esta planta, aunque no muy característica como diferenciadora, es sin embargo receptiva para muchos virus de las solanáceas. En nuestro caso, no han presentado síntoma alguno las varias plantas infectadas.

Nicotiana tabaccum. Variedad white Burley. Solanácea.

Esta planta es una de las especies que se muestra más receptiva para una innumerable cantidad de virus vegetales, en muchos casos con síntomas típicos. En nuestro caso, es una de las pocas que ha manifestado síntomas claros, precisos y característicos.

Las plantas infectadas con la savia de las Petunias enfermas muestran los siguientes síntomas: A los siete o nueve días de la inoculación, aparecen unos ligeros puntos necróticos que van ensanchando su área en los días siguientes hasta producirse pequeños círculos completamente necróticos de hasta tres mm. de diámetro (foto 6).

A los dieciocho o veinte días de la inoculación ya están completamente desarrolladas y no ocurre ninguna evolución más. Hay que hacer notar que el número de estas lesiones es, al final, el mismo que el de pequeños puntos necróticos que aparecen en los comienzos; es decir, a los siete o nueve días, o sea que su número no se incrementa sino que

quedan localizados en los puntos de entrada del virus en la hoja, a través de las microscópicas heridas que produce el carborundo al inocular.

Se han hecho varios intentos de transmisión del virus partiendo de la savia obtenida de las hojas que presentan las lesiones e inoculando varias plantas de tabaco y de petunia, y en ningún caso se consiguió la retransmisión.

Se han hecho nuevos intentos partiendo sólo de las áreas necróticas y zonas más próximas, mediante un paciente recortado de cada una de ellas y diluyendo lo menos posible en agua para obtener las máximas concentraciones de posibles partículas de virus, y tampoco se ha conseguido la reinfección.

Phaseolus vulgaris. Habichuela común. Papilionácea.

En esta especie no se consiguieron síntomas aparentes.

Solanum licopersicum. Tomate. Solanácea.

Hemos inoculado plantas de la variedad Klondine red y de la corriente de España. Aunque estas plantas son receptivas a bastantes virus, en nuestro caso no hemos obtenido síntomas característicos por la inoculación por savia.

Forzando las condiciones intentamos la inoculación por medio del injerto de plantas de Petunia enfermas sobre pies de tomate.

Las plantas crecen raquíticas, con las hojas arrolladas y retorcidas, manteniéndose en estas condiciones deficientes durante algún tiempo, pero no florecen ni fructifican y finalmente mueren.

No creemos que estas condiciones se deban al virus en estudio, pues de estas plantas no se pudo recuperar el virus al inocular a petunias.

Vicia faba. Haba. Papilionácea.

Ninguna de las plantas infectadas presentó síntoma manifiesto.

Vigna sesquipedalis. Negrillas. Papilionácea.

Esta especie no ha sido muy usada como planta indicadora. En nuestro caso, luego de inoculadas, presentaron a los cinco o seis días unos anillos característicos únicamente desarrollados en el punto de infección y con un tamaño de hasta dos mm. y consistentes en un círculo amarillento central, rodeado por un anillo marrón oscuro necrótico. Estos sín-

tomas sólo aparecieron en las hojas infectadas, sin volver a manifestarse en las nuevas, y las plantas crecieron con normalidad sin presentar otro síntoma durante su ciclo.

Como se puede observar, es la segunda especie que, aunque se muestra algo receptiva, localiza también los síntomas en los puntos de entrada del virus.

No se le encontraron inclusiones.

Vigna sinensis. Judías de careta. Papilionácea.

Esta especie es huésped diferencial para algún virus típico, sobre todo para el "Tobacco ring spot".

Tampoco han sido obtenidos síntomas manifiestos.

Zinnia elegans. Zinnia. Compuestas.

No dió síntomas específicos de este virus y no pudo ser recuperado el mismo en inoculaciones a Petunia sana con Zinnia inoculada previamente con el virus.

Los síntomas experimentales producidos por el virus en las plantas de Petunia híbrida.

Hemos dejado intencionadamente para el último lugar la descripción de los síntomas experimentales obtenidos en las plantas de Petunia infectadas por nosotros, para poder describir completamente y con detalles el desarrollo de los mismos y hacer las anotaciones pertinentes.

La descripción de la formación y situación de las inclusiones lo hacemos en un apartado diferente.

Las inoculaciones fueron hechas, al igual que con el resto de las plantas, partiendo de la savia obtenida por trituración y machacamiento en mortero de las hojas procedentes de las Petunias infectadas, empleando como abrasivo polvo de carborundo.

Se inocularon siempre plantas jóvenes para poder seguir su desarrollo durante todo su ciclo evolutivo. Se hicieron las inoculaciones en dos o tres hojas de cada planta.

La aparición de los síntomas no comienza hasta los veinticinco días como mínimo de haber sido inoculadas y se presentan con la aparición

de ligeras motas amarillas en las hojas inferiores, las que fueron inoculadas y las más próximas a ellas, y más tarde van apareciendo ya en las nuevas hojas producidas en el ápice de crecimiento. Esto prueba una transmisión lenta y progresiva del virus a lo largo de la planta, hasta alcanzarla en su totalidad.

Estas manchas amarillentas, cuyo tamaño no alcanza más allá de 2-2,5 mm. y que son relativamente pocas en cada hoja (seis o siete al principio), van aumentando su número de manera progresiva, llegando a ser tan numerosas (más de 200), que enmascaran por completo el color verde de las hojas, de tal manera, que aparecen amarillentas o con jaspeado verde amarillento de gran contraste (foto 5).

Las hojas muy moteadas, finalmente, devienen amarillas por haber sido invadidas totalmente, se secan y caen de la planta.

Las inclusiones comienzan a aparecer cuando se comienza a intensificar el moteado de las hojas, perdurando así en toda la planta, hasta que poco antes de caer las hojas que han amarilleado, desaparecen totalmente. Hay una abundante concentración de inclusiones en las células próximas al ápice, y la concentración es extraordinaria en las células de las flores, como detallaremos en el apartado de las inclusiones.

En algunos casos la infección se manifiesta con considerable intensidad desde el principio, y entonces los moteados son intensos, la planta queda achaparrada, no crece bien y las hojas se distorsionan y arrollan irregularmente. En estos casos, la floración se alcanza difícilmente.

El número y cantidad de flores, en las plantas que presentan síntomas, no difiere apreciablemente del que producen las plantas sanas dejadas como testigo, e igualmente sucede con la forma y tamaño de las flores; sin embargo, éstas se presentan en su apertura con un jaspeado, rompimiento de color en estrías y dibujos irregularmente claros y oscuros. Al igual que las que observamos inicialmente en el lugar de origen, estas flores presentan en su envés una serie de círculos, orillados por una fina línea de color más intenso, que se prolonga hasta la parte tubulosa de la flor.

Como se observa en toda la evolución de estos síntomas apuntados, se han visto reproducidos todos los síntomas que observamos visualmente en las plantas estudiadas inicialmente.

Las flores dan lugar a la producción de semillas en los receptáculos,

cuyo número no es menor que el de las plantas sanas, y que sembradas de nuevo dan lugar a plantas sanas por completo.

Esquematizamos y resumimos los síntomas apuntados en páginas anteriores, en el cuadro adjunto para tener una visión de conjunto de las características del virus con sus huéspedes posiblemente diferenciales.

En él se puede apreciar que sólo se muestran dos especies receptivas al virus de la *Petunia*, la *Nicotiana tabacum* y la *Vigna sexquipedalis*.

ESPECIE	FAMILIA	SINTOMAS	TIEMPO AP SINT. INVER.
Beta vulgaris var. Rapa.	Quenopodiáceas...	No aparecen	—
Brassica chinensis... ...	Crucíferas	No aparecen	—
Capsicum annum	Solanáceas	No aparecen	—
Citrulus vulgaris	Cucurbitáceas ...	No aparecen	—
Cucurbita pepo...	Cucurbitáceas ...	No aparecen	—
Datura stramonium ...	Solanáceas	No aparecen	—
Nicotiana glutinosa. ...	Solanáceas	No aparecen	—
Nicotiana rústica	Solanáceas	No aparecen	—
Nicotiana tabacum. ...	Solanáceas	Manchas necróticas.	A siete-nueve días.
Phaseolus vulgaris. ...	Papilionáceas. ...	No aparecen	—
Solanum licopersicum...	Solanáceas	No por inoculación arroll. por injerto.	A los treinta días, síntomas dudosos.
Vicia faba	Papilionáceas. ...	No aparecen	—
Vigna sexquipedalis ...	Papilionáceas. ...	Círculos necróticos con anillación ...	A cinco-seis días.
Zinnia elegans...	Compuestas... ...	No aparecen	—
Petunia sp.	Solanáceas	Moteado amarillo en hojas Breaking y estrías de color en flores	A los veinticinco días.

Las inclusiones intracelulares del virus de la Petunia.

A) *Descripción de las mismas.*

Las inclusiones intracelulares son del tipo amorfo o cuerpos X y se encuentran ya completamente formadas cuando el moteado comienza a intensificarse y a hacerse uniforme en toda la planta.

Normalmente sólo aparece una inclusión por cada célula de la hoja, salvo en los casos previos de formación en que puede aparecer en varios puntos de la célula a la vez.

Se encuentran situadas junto al núcleo de las células casi constantemente, y aunque se observan en algunos casos inclusiones alejadas del núcleo, no es lo corriente.

La situación en los tejidos del vegetal es bastante amplia, pero se encuentran localizadas preferentemente en los tejidos metabólicamente activos. Así, no las hemos encontrado en las raíces ni en los tejidos hadro-xilemáticos del tallo, pero sí las hemos encontrado en las partes verdes de los tallos y sus tricomas, así como en toda la epidermis foliar, tanto del haz como del envés, y en los parénquimas lagunar y en empalizada, verdes y en las células estomáticas.

También se han encontrado, y muy abundantes, en todas las células de las flores, tanto parenquimatosas como epidérmicas y tricomatosas. En las flores se presentan mucho más densas y compactas que en el resto de la planta, y el tamaño que alcanza aquí con respecto al núcleo de la célula es también mucho mayor. Mientras que en las células verdes de la planta tienen un tamaño aproximadamente igual al núcleo celular o poco más, en las células florales se manifiestan de un tamaño doble o triple con relación a ese núcleo.

Las inclusiones intracelulares se presentan, al microscopio óptico, como un agregado de partículas muy refringentes y claramente perceptibles en el conjunto de la masa total que forma la inclusión. No presentan membrana externa de separación, aunque en algunos casos se hayan densificado tanto (foto 13) que adquieran una forma circular manifiesta y perfectamente delimitada.

Sin embargo, al manipularlas, para su extracción y preparación para su visión al ultramicroscopio, con microagujas o micropipetas, o al rom-

per las células en el seno del agua, se diluyen y fraccionan en trozos o segmentos más pequeños.

B) *Proceso de formación de las inclusiones.*

Hemos seguido el proceso de formación de las inclusiones celulares en las plantas infectadas de nuestro invernadero.

El comienzo de su aparición coincide poco más o menos con el de aparición de síntomas externos, es decir, luego de los quince o veinte días de la infección, cuando empiezan a aparecer los moteados en las hojas.

En las células de éstas, y diseminados en el protoplasma, comienzan a aparecer unos puntos o gránulos de aspecto más o menos cristalino diseminados en los cloroplastos y que parecen ser llevados por las corrientes citoplasmáticas, cuando se observan en células todavía vivas.

Estos puntos aparecen con un tono azulado, al principio; es decir, cuando están separados o a lo sumo en grupos de tres o cuatro, frente al colorante floxina, que es el usado por nosotros para seguir el proceso. Este colorante tiñe de rojo al núcleo e inclusiones producidas por virus. Estos puntos iniciales van siendo reunidos por las corrientes citoplasmáticas en grupos más numerosos (foto 7), y entonces van cambiando los tonos azules iniciales por los tonos rojos de la floxina.

A su vez, estos grupos van siendo reunidos en otros más grandes hasta quedar totalmente agrupados en uno solo, que va emigrando lentamente hacia el núcleo (fotos 8, 9 y 10). Entonces son claramente visibles, con su refringencia característica, y ya toman fuertemente el color rojo definitivo de la floxina.

Al parecer, los coroplastos, a diferencia de lo que ocurre en algún otro virus de los vegetales, no tienen ninguna influencia en la formación de éstas inclusiones, ni como material de aporte proteico, puesto que, como puede observarse en algunas de las fotos, coexisten perfectamente con las inclusiones, sin deformación aparente.

Las inclusiones observadas al microscopio electrónico se presentan como agregados de partículas esféricas que se pueden encontrar muy próximas al núcleo íntimamente adheridas a él (foto 15), ya sea rodeándole casi completamente o solamente quedando conectadas por un lado, tal como se observan en el interior de las células por medio del micros-

copio óptico, pero también se pueden observar separadas del núcleo, observándose en ellas igualmente el material corpuscular de que están constituídas.

Estas inclusiones sueltas son muy lábiles y fácilmente disgregables por las manipulaciones en partículas y corpúsculos elementales (partículas virus) mucho más pequeños (foto 16).

Haciendo un cálculo, midiendo las partículas más pequeñas y uniformes, que además presentan una regularidad de tamaño muy característica, obtenemos como tamaño real del virus el de partículas esféricas de unas 16-20 milimicras de diámetro.

El siguiente cuadro es un intento de clasificación general de las inclusiones intracelulares producidas por virus de plantas, y podemos ver que las producidas por el virus de la Petunia en estudio se encontrarían dentro del grupo B, amorfas y tipo granular del que hemos puesto cuatro ejemplos.

TIPO DE INCLUSION	LOCALIZACION	ALGUNOS EJEMPLOS
A) Cristalinas... ...	En el citoplasma... ...	T. M. V. y sus estirpes (Iwanowsky).
		Tobacco ring spot (Woods).
		Mosaico Aucuba del tomate.
		Petunia ring spot (Rubio).
	En el núcleo...	Red clover (Porter 1952).
		Severe etch virus (Kassanis).
		Pea mosaic (McWorther 1941).
B) Amorfas	Tipo ameboide (generalmente vacuoladas).	Tobacco mosaic virus (Iwanowsky).
		Virus X de la patata (Smith).
		Turnip yellow virus (Rubio).
	Tipo granular, a veces fibroso	Mosaico aucuba (Sheffield 1931).
		Rumex virus (Martínez Cordón).
		Brassica V. 1 (Cabagge b. r.). (Rubio).
		Broad beed mottle. (Rubio y van Slogteren).
	Tipo no vacuolado, con membrana	Cauliflower mosaic (Rubio).
		Wound tumor virus (Littau y Black).

Puntos límites de inactivación y dilución.

Para obtener más datos que definan y delimiten al virus que nos ocupa, hemos hecho algunas pruebas características de dilución y el punto térmico de inactivación.

a) *Punto térmico de inactivación.* Este es un dato característico para los virus vegetales, y se trata de buscar la temperatura a la que resiste el virus un calentamiento sin perder su poder infectivo, es decir, sin que se desnaturalice la proteína virus.

Lo hemos llevado a cabo extrayendo la savia de las hojas de plantas infectadas, y eliminando las partículas sólidas groseras, por filtración, hemos separado varias fracciones en diversos tubos de ensayo, a los que hemos sometido a diferentes temperaturas durante diez minutos, y luego hemos inoculado las plantas ayudados por el carborundo, como abrasivo.

Las plantas utilizadas en la inoculación han sido de *Nicotiana tabacum*, que da una respuesta bastante rápida, según dijimos anteriormente, y con síntomas de puntos necróticos, y las Petunias, de respuesta un poco más lenta.

Como resultado hemos obtenido como punto térmico de inactivación entre 50° C. y 55° C.

b) *Punto límite de dilución.* La obtención de la savia y forma de infectar las plantas de las pruebas ha sido realizada de la misma manera que en las pruebas anteriores. Hicimos diluciones en agua destilada y tampón fosfato a 1/10, 1/100, 1/150, 1/250 y 1/500 quedando fijado tras diferentes inoculaciones el punto límite de dilución entre 1/100 y 1/150.

Transmisión del virus.

Para intentar aclarar este punto sembramos 200 retoños con semillas de plantas enfermas.

Pues bien, de las 200 plantas mantenidas en el invernadero, procedentes de las semillas de Petunias enfermas, ninguna de ellas reprodujo síntoma alguno de la enfermedad.

Con una proporción de este tipo 0/200, podemos asegurar que el virus no es transmisible por las semillas de las plantas enfermas.

Transmisión por insectos.

Sólo se han hecho pruebas con el áfido *Myzus persicae* Sultz y no transmite el virus.

Inactivación parcial del virus con la exposición al aire.

El hecho de que no todas las hojas infectadas (las de *N. Tabaccum* sobre todo) presentaran un número aproximadamente igual de lesiones, a pesar de que fueran infectadas con savia de la misma dilución, nos hizo pensar que pudiera ser debido a una pérdida de la actividad por la exposición de la savia al aire. Para comprobar esta suposición realizamos el siguiente experimento.

Sobre un lote de seis plantas de *N. Tabaccum,* hicimos infecciones en tres hojas de cada una de ellas dejando pasar diez minutos de intervalo entre el momento de infección de una a otra, usando savia diluída al 1/5, que se dejaba expuesta al aire del invernadero. Los resultados fueron los siguientes:

	NUMERO DE LESIONES OBSERVADAS POR HOJA		
	Primera hoja (*) — (A los 10')	Segunda hoja — (A los 20')	Tercera hoja — (A los 30')
1.ª planta	48	23	7
2.ª planta	53	20	3
3.ª planta	34	12	5
4.ª planta	36	20	0
5.ª planta	26	19	6
6.ª planta	40	14	6

(*) Los tiempos indicados expresan los transcurridos desde la extracción de la savia de las hojas de Petunias enfermas hasta el momento de la inoculación.

Como se observará fácilmente, en todas las plantas de *N. tabaccum* inoculadas, hay un descenso paulatino del número de lesiones producidas en la inoculación, relacionado con el tiempo transcurrido en la ex-

posición de la savia al aire; es decir, que el virus sufre una inactivación por su exposición al aire.

Resumen de las características del virus.

Con todos los datos experimentales hasta ahora mencionados podemos hacer un resumen de las caracteristicas de este virus.

Este virus se presenta como típico de las Petunias, de las que es fácilmente transmisible de unas a otras por medio de la savia extraída de plantas enfermas.

Es difícilmente transmisible a otras especies vegetales, siendo la *Nicotiana tabaccum* y *Vigna sexquipedalis* las que se presentan como receptivas, aunque con síntomas muy diferentes y localizados que no se pueden transmitir a su vez.

Los síntomas producidos en Petunia son moteado amarillo de las hojas, que va extendiéndose hasta hacer desaparecer las zonas verdes, y estriamiento y rompimiento de color en la cara anterior de la corola de las flores con la presencia de unos círculos concéntricos por la posterior.

Son típicas las inclusiones celulares, y caracterizan específicamente al virus. Son de tipo granular con gránulos gruesos muy visibles.

No es transmisible por las semillas y es poco probable que lo sea por los insectos, aunque no se descarta totalmente un vector específico.

Algunas de sus constantes características son:

Punto térmico de inactivación entre 50° y 55° C.
Punto límite de dilución $= 1 \times 10^{-2}$.

Se inactiva bastante con la exposición al aire a la savia que lo contiene.

Las partículas virus se presentan como pequeñas esferas de unas 16 a 20 milimicras de diámetro.

DISCUSION

En el presente trabajo hay algunos puntos que merecen ser destacados y que iremos aclarando poco a poco. Uno de los primeros es el hecho de que este virus pueda ser una especie nueva no descrita todavía en la literatura sobre virus vegetales.

Aunque Hoggan, en 1927, describe un mosaico de la Petunia al que denomina Petunia virus 1, esta denominación no ha sido recogida ni confirmada en la literatura actual sobre virus, por haberse demostrado claramente que este mosaico era causado por un virus conocido del tabaco.

La Petunia, planta ornamental muy abundante en diversos países, ha sido descrita algunas veces como planta receptiva para algunos virus.

En un nuevo y muy reciente libro de K. M. Smith, la última edición del "Textbook of plant virus diseases" (1957), que viene presentado como un verdadero diccionario descriptivo de todos los virus conocidos mundialmente, no se describe ningún virus típico de la Petunia; sin embargo, esta especie se señala como resceptiva de veintiséis virus, que por orden alfabético vamos a señalar a continuación:

1.	*Aster yellow virus.*	pág.	34	P. hybrida Vilm.
2.	*Beet curly top virus*	"	73	" " "
3.	*Curly top virus of sugar beet* (argentine)	"	87	" sp.
4.	*Cabbage black ring spot-virus.*	"	116	" hybrida
5.	*Cabbage ring necrosis virus* ...	"	118	" Vilm.
6.	*Carrot mottly dwarf virus* ...	"	137	" sp. var Rosa of Haven.
7.	*Cauliflower mosaic virus* ...	"	132	" hybrida Vilm.
8.	*Chrysanthemun aspermy virus*	"	153	" sp.
9.	*Chrysanthemun mosaic diseases*	"	158	" hybrida
10.	*Cramberry false blossom virus*	"	196	" hybrida host
11.	*Cucumber mosaic virus*	"	223	" sp. var Rosy Morn.
12.	*Currant (red) ringspot virus*	"	235	" hybrida

13.	*Delphinium ringspot virus* ...	pág.	246	P. hybrida Crimsom-king.
14.	*Hembane mosaic virus*	"	269	" sp.
15.	*Nasturtium ringspot virus* ...	"	307	" sp.
16.	*Potato virus X*	"	389	" sp.
17.	*Potato virus Y*	"	396	" sp.
18.	*Tobacco leaf curl virus*	"	504	" sp. var violácea.
19.	" *mosaic virus*	"	515	" sp.
20.	" *ringspot virus*	"	541	" sp.
21.	" *streak virus*	"	551	" sp. sp. violácea.
22.	*Tomato black ring virus* ...	"	557	" sp.
23.	" *bushy stunt virus* ...	"	563	" sp.
24.	" *ring spot virus*	"	571	" hybrida grandiflora Vilm.
25.	" *spotted wilt virus* ...	"	574	" sp.
26.	*Tulip white streak*	"	593	" sp.

El estudio de cada uno de estos virus para mostrar las diferencias con el nuestro de la Petunia sería una cosa muy larga y extremadamente confusa; por tanto, vamos a tratar de eliminarlos por grupos de características que difieren fundamentalmente de los del virus de Petunia 1.

Así nos quedarán automáticamente eliminados:

a) Por no ser transmisible por la savia.

1. *Aster yellow virus.*
2. *Beet curly top virus.*
10. *Cramberry false blossom virus.*
18. *Tobacco leaf curl virus.*

b) Por su forma de bastones rectos o flexuosos (el Petunia virus 1 es esférico).

2. *Beet curly top virus.*
4. *Cabbage black ring-spot virus.*
9. *Chysanthemun mosaic diseases.*
11. *Cucumber mosaic virus.*
14. *Hembane mosaic virus.*
16. *Potato virus X.*
17. *Potato virus Y.*
19. *Tobacco mosaic virus.*
24. *Tomato ring spot-virus.*

c) Por diferir grandemente en alguna de sus características:

3. *The argentine curly-top virus* (P. T. = 75-80° C.).
7. *Cauliflower mosaic virus* (P. T. = 70° C.) (P. L. D. = 1/2.000). Las inclusiones del Cauliflower son muy distintas a las nuestras, así como sus huéspedes.
12. *Currant (red) ringspot virus* (P. T. = 86-88° C.) (P. L. D. = 1/2.000 hasta 1/5.000).
25. *Tomato spoted wilt virus* (P. L. D. = 1/10.000) y huéspedes.

Como podemos constatar de una rápida observación, ya hemos podido eliminar dieciséis de los veintiséis virus que habían sido descritos como infectantes de las plantas de Petunia.

Si observamos a continuación, estudiando un poco más a fondo el resto de los virus, tampoco éstos pueden ser los que infectan a las plantas de Petunia estudiadas en el presente trabajo.

Así tenemos:

5. *Cabbage ring necrosis virus.* (P. L. D. = 1/500-1/600). Su huésped diferencial es la *Beta vulgaris*, en la que produce numerosas manchas locales que aumentan de tamaño y número hasta que llegan a ocupar toda la hoja, que finalmente se seca y muere.

6. *Carrot mottly dwuarf virus.* Localizado únicamente en Australia. Huéspedes diferenciales = *Petunia, Datura stramonium* y *Nicotiana tabacum.* Los síntomas aparecen en el tabaco desde los veinte a los cuarenta días después de la infección. Los síntomas: un aclaramiento de venas seguido de necrosis de las mismas.

8. *Crysanthemun aspermy virus.* Produce aclaramiento de venas a *Nicotiana tabacum.* Distorsión y "enations" sobre *Nicotiana glutinosa.* Veteado en *Petunia.* Ataca al tomate produciéndole enanismo.

13. *Delphinium ringspot virus.* P. T. = 65° C. (P. L. D. = = 1/1.000). Sobre *Petunia* produce unos síntomas primarios de lesiones necróticas oscuras de un mm. de diámetro que aumenta progresivamente de tamaño hasta alcanzar unos 10 mm. a las dos semanas de la inoculación.

15. *Nasturtium ringspot virus.* Produce anillos necróticos concéntricos sobre *Nicotiana glutinosa* y *Nicotiana tabacum.*

20. *Tobacco ringspot virus.* Este fué uno de los virus que primeramente sospechamos pudiera estar infectando nuestras petunias. Por ello probamos y buscamos la infección de las plantas diferenciales específicas con los siguientes resultados:

N. tabaccum. Los síntomas no se parecen en nada.
Vigna sinensis. No se muestra receptiva.

Por otra parte es transmitido por lo menos en un 18,2 por 100 por las semillas de *Petunia,* y las nuestras no lo han hecho.

Finalmente, parece haber sido hallado recientemente (Rubio Huertos en un trabajo inédito) en otras Petunias con síntomas muy diferentes que presentaban unas inclusiones muy típicas cristalinas y muy distintas a las nuestras.

21. *Tobacco streak virus.* Es muy difícil de transmitir mecánicamente. P. L. D. = 1/20.

22. *Tomato blak ring virus.* No hemos conseguido los síntomas de manchas negras sobre tomate en todos nuestros intentos.
23. *Tomato bushy stunt.* Las plantas diferenciales, *Vigna sinensis, Datura stramonium* y *Phaseolus vulgaris,* no han conseguido ser infectadas por nosotros así como tampoco las plantas de tomate.
26. *Tulip white streak.* Este virus se encontró infectando un solo tulipán en el jardín de Kenneth M. Smith en la primavera de 1950. Los síntomas sobre *N. glutinosa* y *Phaseolus vulgaris* son tan diferentes que nos lo elimina totalmente.

De una manera muy esquemática hemos presentado un repaso de todos los virus que pudieran infectar posiblemente nuestras petunias, y hemos visto que hay suficientes diferencias para eliminar esta posibilidad.

Nosotros hemos hecho el estudio cuidadoso de cada uno de ellos y hemos obtenido el convencimiento de que ninguno de todos ellos puede ser el que presentaban nuestras plantas de Petunia; por ello afirmamos que hay un fuerte porcentaje de probabilidad de que nuestro virus sea nuevo en la Fitopatología, y para el cual proponemos la denominación de Petunia virus 1 o virus del moteado amarillo de la Petunia. (*Petunia Yellow mottle virus*).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha hecho un estudio de un virus encontrado en unas plantas del género *Petunia hybrida,* que se localizaron en el jardín que posee la Institución de Formación del Profesorado de Enseñanza Laboral de Madrid.

Por las características anotadas y los métodos seguidos en el trabajo experimental podemos presentar las siguientes conclusiones.

1.ª Se ha demostrado por medio de inoculaciones experimentales a plantas sanas y un estudio sistemático de su fitopatología, que la enfermedad padecida por las plantas de *Petunia hybrida* —familia solanáceas— observadas inicialmente es producida por un virus.

2.ª Se han estudiado detalladamente las características de dicho virus, observándose que hay un extraordinario porcentaje de probabilidades de que se trate de un virus nuevo en la Fitopatología, no descrito con anterioridad.

3.ª Las características de dicho virus son las siguientes:

a) *Sintomatología.* En las petunias produce un moteado amarillo en sus hojas que se extiende a toda la planta y cuyo número de manchas aumenta hasta casi totalizarlas. En las flores se presenta un estriamiento y rompimiento de color en la cara coroloidea y un anillamiento característico en el envés coroloideo.

b) *Plantas receptivas.* De las dieciséis especies estudiadas, además de la Petunia sólo dos se han mostrado receptivas: *N. tabacum,* con síntomas de lesiones necróticas puntuales que no progresan mucho, y *Vigna sexquipedalis* con puntos necróticos anillados de negro que tampoco progresan.

c) *Transmisión.* Fácilmente transmisibles por inoculación mecánica de la savia de plantas enfermas y poco probable por los insectos. No por las semillas.

d) *Constantes fisicoquímicas.* Punto térmico de inactivación = 50-55° C. Punto límite de dilución = 1×10^{-2}.

e) *Inactivación.* Se inactiva bastante rápidamente por exposición al aire de la savia de las Petunias enfermas.

4.ª Se ha estudiado también la histopatología de las plantas infectadas por este virus, habiendo encontrado que produce inclusiones típicas, aumentando así en uno, más la lista de los virus vegetales que presentan esta cualidad.

5.ª Se ha conseguido determinar, por medio de inoculaciones periódicas, el modo de formación de dichas inclusiones producidas por la reunión de gránulos refringentes que aparecen en el citoplasma luego de los veinticinco días de la inoculación y coincidiendo con los primeros síntomas externos.

6.ª Las inclusiones son del tipo amorfo o cuerpos X, redondos y ovales, de tipo granular, refringentes, y se suelen encontrar junto al núcleo, presentando un tamaño semejante al de éste, en las hojas, y de dos o tres veces mayor en las flores.

7.ª Se ha estudiado la constitución de las inclusiones por medio del microscopio electrónico, viéndose que están formadas por una serie de partículas aproximadamente esféricas de virus, y parte de material amorfo inidentificable.

8.ª Por microscopia electrónica se ha estudiado también la forma y tamaño del virus en estudio, viéndose que las partículas elementales son aproximadamente esféricas con 16 a 20 milimicras de diámetro.

9.ª Se comparan y discuten las propiedades de este virus con las de aquellos otros ya descritos que tienen capacidad para infectar especies de Petunia, viéndose que no coinciden en modo alguno.

10. Dadas las características del virus se propone asignarle el nombre de Petunia Virus 1 o bien el de Virus del moteado amarillo de la Petunia (*Petunia mottle yellow virus*) según las tendencias actuales para la denominación de los virus vegetales.

SUMMARY

A virus found infecting plants of *Petunia hybrida* in a garden of Madrid has been studied.

Characteristics of the virus:

Symptomatology: In Petunia it produces a bright yellow mottle in the leaves and dark rings in the discolored petals of the flowers. *In N. Tabacum* it gives small dark brown necrotic lesions in the inoculated leaves. The infection does not become systemic. In *Vigna sexquipedalis* it gives also necrotic lesions in the inoculated leaves and there is no systemic infection.

Fourteen others different species of plants were inoculated with the sap of infected petunias with negative results.

The virus produces inclusion bodies in the cells of *Petunia* infected with it. These bodies are of the granular type and its formation and properties have been studied. They are composed of virus particles and amorphous material as seen by electron microscopy.

The virus is easily transmitted by mechanical inoculation with sap It is not transmitted by the seeds, its termal inactivation points is between 50-55° C. and its dilution end point 1×10^{-2}.

The properties of this virus are compared with those of the different viruses able to infect petunia sp. and it is concluded that the virus is probably a new one. The name of Petunia yellow mottle is proposed for this virus.

BIBLIOGRAFIA

Bald, J. G. 1948. The structure of plastids and other cytoplasmic bodies in fixed preparations of epidermal strips. Aust. J. Sci. Res. Serie B. I. 458-463.

Bald, J. G. 1948. The development of amoeboid inclusions bodies of tobacco mosaic virus. Aust. J. Sci. Res. Serie B. I. 452-457.

Bald, J. G. 1949. A method of the selective staining of viruses in infected plant tissues. Phytopat, 39 (5). 385-402.

Bawden, F. C. 1950. Plant viruses and virus diseases. Waltham Mass. U. S. A. 3.ª edición.

Bawden y Sheffield. 1939. The intracellular inclusions of some plant diseases. Ann. Appl. Biol. 26: 102.

Bawden y Nixon, H. L. 1951. The aplication of electron microscopy to the study of plant viruses in impurified plant extracts. J. Gen. Microbiol. V. 104-109.

Brandes, J. 1956. Uber das Auschen und die Verteilung das Tabakmosaikvirus in Blattgewebe Elektronenmikroskopische Untersuchungen an ultradünnen Mikrotomschnitten. Phytopathologische Zeitschrift. 26 (1). 93-106.

Goldstein, B. 1924. Cytological study of living cells of tobacco plants affected with mosaic disease. Bul. Torrey Bot. Club. 51: 261-273.

Hirai, T. y Matsui. 1956. An electron microscope study of the wheat mosaic virus Marmor tritici Holmes. Forsch. Gebiet. Pflanzerkrankh. 6 (2) 61.

Iwanowski, D. 1903. Uber die mosaik-krankheit der tabakspflanze. Ztsechr. f. Pflanzerkrankh. 13: 1-41.

Kassanis, B. 1939. Intranuclear inclusions in virus infected plants. An. App. Biol. 26: 705-709.

Koshimizu, Y. 1955. Leucoplasts as an origin of intracellular inclusions and site of virus reproduction. Abstracts of papers presented at the Annual meeting of the Phitopath. Soc. Japon held on April.

Koshimizu y Izuka. 1956. Origins and formation of intracellular inclusions associated with two leguminous virus diseases. Sonderahdruck aus. Band. Helft. 1.

Martínez, F. y Rubio, H. 1947. Formación de inclusiones intracelulares en el mosaico del tabaco. Memoria Estac. Fitopat. Coruña, pág. 71-73.

Martínez, F. 1951. Nuevos síntomas en el "Dock Mosaic" causados por el Rumex virus I. Microb. Españ. Vol. IV (2-3), 109-114.

Matsui Chiaki. 1956. The electron microscopic observations of tobacco mosaic virus infected tissue by ultrathin sectioning. Virus (Japón), 357-362.

Mc. Worther, F. P. 1941. Isometic crystals produced by pisum virus 2 and phaseolus virus 2. Phytopatology, 31: 760-761.

Mc. Worther, F. P. 1941. Plant virus differentiation by tripan blu reactions within infected tissue. Stain. Tech. XVI. 143.

Rawlins, T. E. y Jhonson. 1925. Cytological studies on the mosaic disease of tobacco. Amer. Jour. Bot. 12: 19-32.

Rawlins, T. E., Weierich y Schlegel. 1956. A histochemical study of certain plant viruses by means of the Sakaguchi reaction of Arginine. Virology. 2. 308-311.

Rodríguez Sardiña, Martínez Cordon y Rubio, H. 1948. Consideraciones acerca de las técnicas de tinción de inclusiones en las virosis vegetales. Bol. Pat. Veg. Ent. Agri. XVII. 1-14.

Rubio Huertos, M. 1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. Microb. Españ. 3. 207-232.

Rubio Huertos, M. 1953. Estudio de una nueva estirpe de Brassica virus L. y sus inclusiones intracelulares. Microb. Españ. 6. (3). 255.

Rubio Huertos, M. 1953. Nuevo método para determinar los síntomas precoces de virosis en las plantas. Microb. Españ. 6 (2). 149.

Rubio Huertos, M. 1954. Rapid extraction of intact crystalline inclusions from the cells of plants infected with tobacco mosaic virus. Nature 174-313.

Rubio Huertos, M., y Slogteren, 1956. Light and electron microscopy of X bodies associated with broad-bean mottle virus and phaseolus virus 2. Phytopat. 46 (7) 401-402.

Rubio Huertos, M. 1956. Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. Phytopath. 46 (10). 553-556.

Rubio Huertos, M. 1957. Los virus de las plantas. Monografía del C. S. I. C.

Rubio Huertos, M. 1957. Un nuevo tipo de inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. Microb. Españ. X (1). 43-51.

Sheffield. 1930. Intracellular bodies in plant virus diseases. Nature. 125: 129-201.

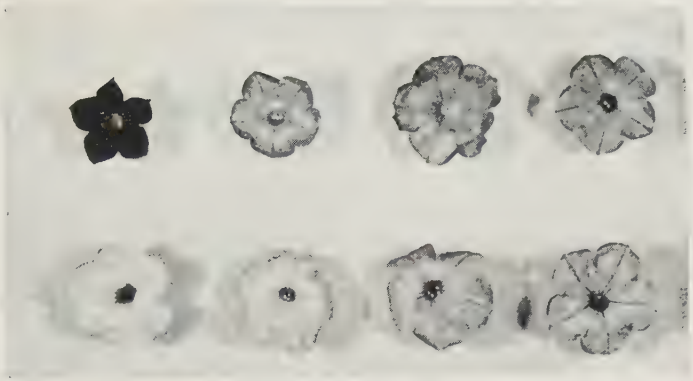
Sheffield. 1934. Experiments bearing on the nature of intracellular inclusions in plant virus diseases. Ann. App. Biol. 21: 430-453.

Sheffield. 1941. II The cytoplasmic and nuclear inclusions associated with severe etch virus. Jour. R. Mcr. Soc. 61. 30-45.

Sheffield. 1946. Preliminary studies in the electron microscope of some plant virus inclusion bodies. J. Royal. Micr. Soc. 66: 69-76.

Smith, K. M. 1957. Textbook of plant virus diseases. Churchil. Lted. London.

Woods, M. 1933. Intracellular bodies associated with Ring-spot. Contrib. Boyce. Tompsom. Inst. 5. 419-434.



Fotos 1 y 2.
Aspecto de las flores de las Petunias sanas.

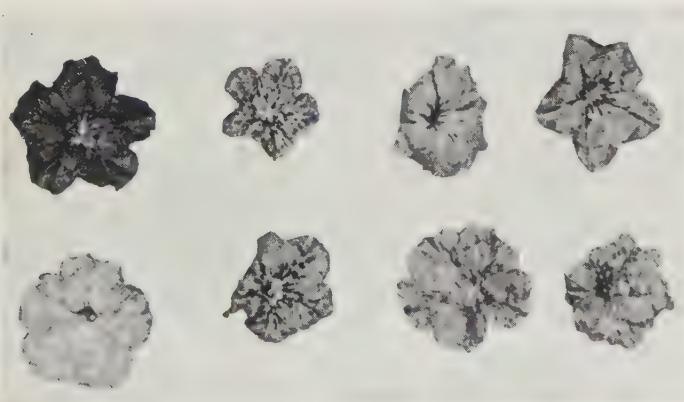


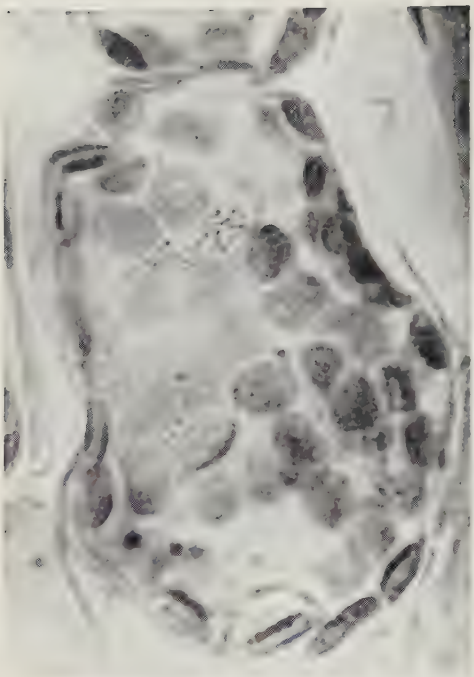
Foto 3.
Flores de Petunias enfermas mostrando el moteado, estriamiento y "braking" en sus corolas.

Foto 4.
Aspecto general de las Petunias infectadas.

Foto 5.
Hojas de Petunias enfermas mostrando el moteado característico (en negro).

Foto 6.

Hojas de *N. tabaccum* mostrando los círculos necróticos que aparecen al ser infectadas. Las fotos 5 y 6 han sido tomadas por el método de impresión directa de Rubio.



7

8

9

10

Fotos 7, 8, 9 y 10.

Algunas fases del proceso de formación de las inclusiones intracelulares. Obsérvese la gran refringencia de los gránulos.

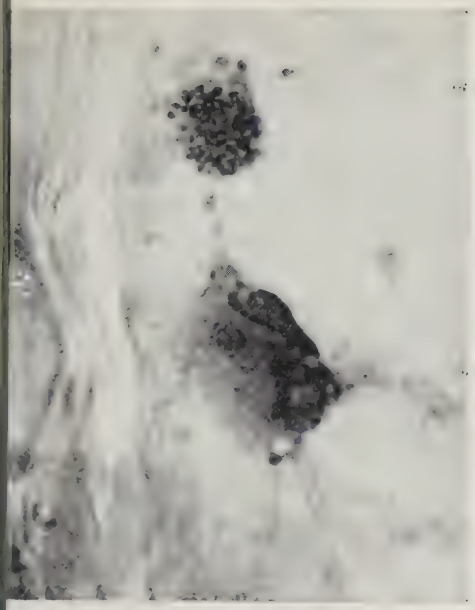


Foto 11.
a inclusión ya formada se aproxima al núcleo.

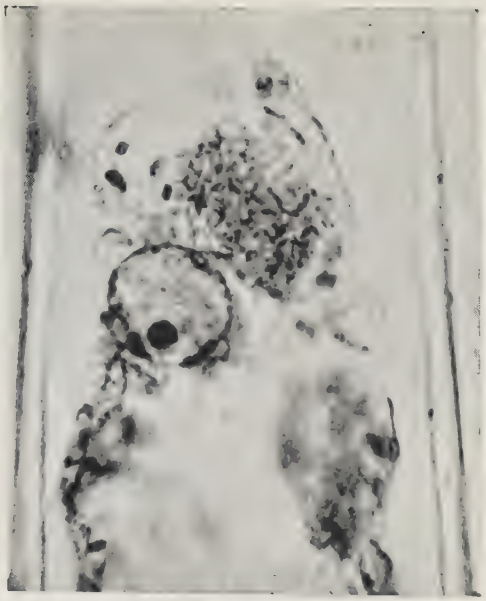


Foto 12.
Una inclusión en una célula de tricoma foliar. Su tamaño es casi igual al núcleo.

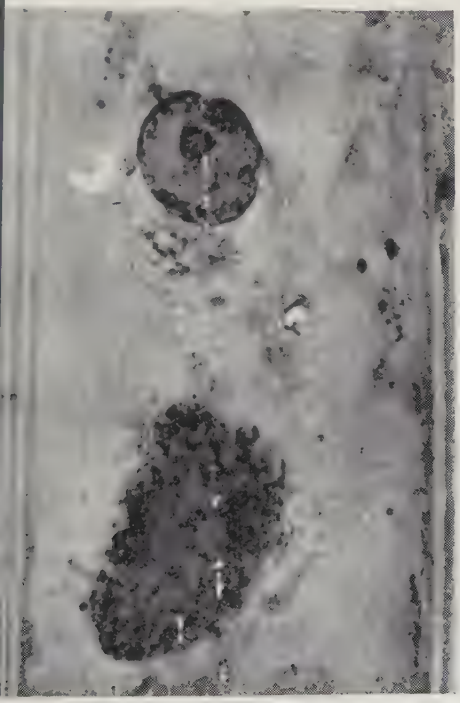


Foto 13.
lusión de tricoma floral. Obsérvese su tamaño comparado con el del núcleo.

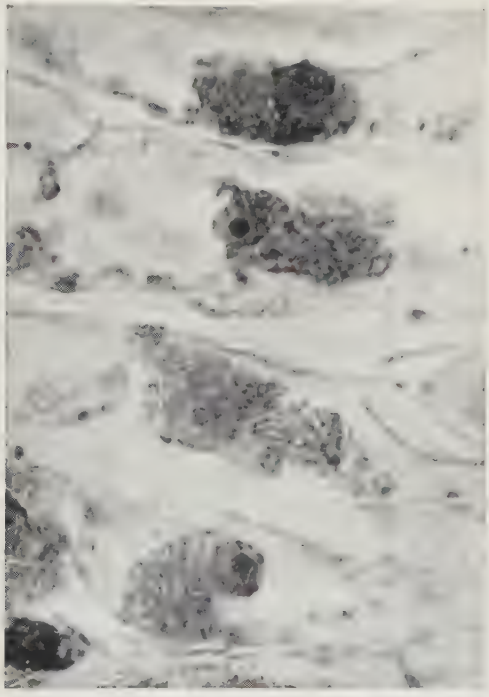


Foto 14.
Inclusiones en las células del parenquima floral. Son muy abundantes y también de mayor tamaño que el núcleo.

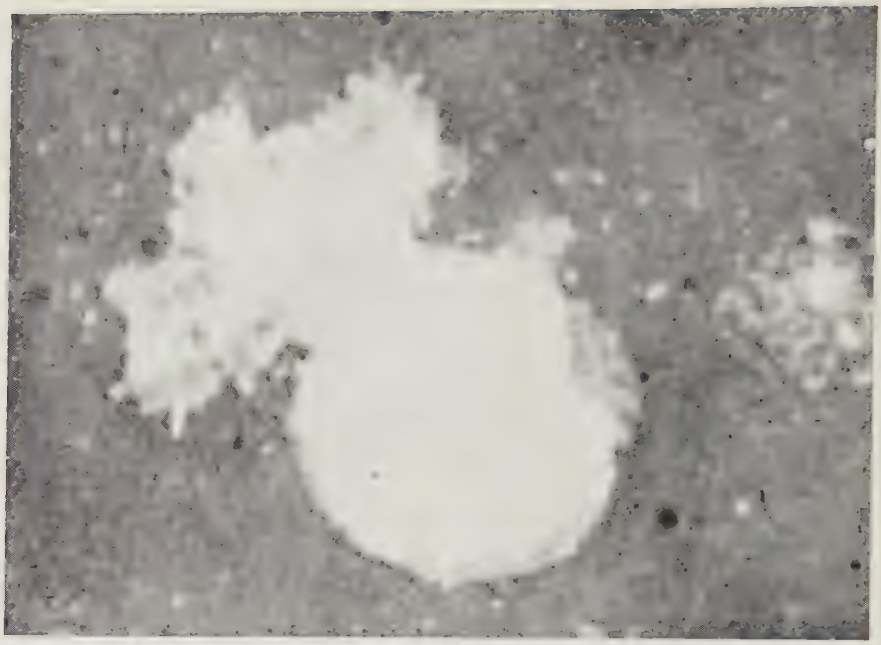


Foto 15.

Inclusión junto a un núcleo observada al microscopio electrónico.

Foto 16.

Partículas virus vistas al microscopio electrónico. Las partículas elementales son las de menor tamaño que pueden observarse muy abundantes.
Sombreado con paladio × 14000.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

III. Influencia de los alcoholes en la fermentación en superficie.

POR

José Luis MALO ECHEVARRIA y Benito REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

En trabajos anteriores, Malo & Regueiro (1957-1958) estudiaron algunos factores que intervienen en la producción de ácido cítrico, por fermentación de un medio sintético por el *Aspergillus niger,* en superficie.

Continuando estos trabajos, se trata en el presente de estudiar la influencia que los alcoholes de bajo peso molecular ejercen sobre la producción de ácido cítrico por fermentación, y que algunos autores demostraron ser beneficiosos.

En una parte estudiamos la influencia de diferentes alcoholes, y en otra estudiamos la influencia del metanol en relación con otros factores del medio.

REVISION BIBLIOGRAFICA

En el curso de trabajos realizados por la División de Fermentación, del N. R. R. L. (Peoria), se descubrió que la adición de alcoholes de bajo peso molecular al medio de fermentación aumentaba grandemente la producción de ácido cítrico, en superficie y en sumergido.

El trabajo más importante sobre la acción de los alcoholes en la fermentación cítrica es el de A. J. Moyer (1953), que abarca numerosos

factores, pero que nosotros limitaremos a medio sintético y fermentación en superficie

La principal característica de una fermentación en superficie que produce elevada cantidad de ácido cítrico, es su poca o ninguna esporulación. Ya Clark (1899) había observado que un medio con cierta cantidad de etanol estimulaba la producción de micelio, pero inhibía la esporulación del *Aspergillus niger;* dicho autor no relacionó esta acción con la producción de ácido cítrico.

Moyer (1953) prueba la acción del metanol, etanol e isopropanol en la producción de ácido cítrico en un medio sintético (añade un poco de "corn steep"), con el *Aspergillus niger* N. R. R. L., 567. Obtiene la máxima producción (66,1 % conversión), con un 3 % de metanol. Con 3 % de etanol obtiene menos (52,9 % de conversión), en ambos casos hay reducción de crecimiento, inhibición de la esporulación y aumento en el consumo de azúcar. Con isopropanol se encuentra bajo rendimiento, debido a su toxicidad.

La respuesta a la acción del metanol depende de la raza de hongo utilizada, que también produce diferencias de color en el micelio, que puede ir de blanco a naranja fuerte, aunque esta producción de pigmento no es correlativa con la producción de ácido cítrico.

Foster (1949) había mostrado que el etanol podía ser asimilado por los hongos y convertido en ácido cítrico, mientras que el metanol no era asimilado. Cuando se añaden estos alcoholes a un medio sintético, se encuentra que al aumentar la concentración de metanol, aumenta la formación de ácido cítrico, pero no la de micelio, el cual sí aumenta cuando se añade etanol. Es decir, que éste se utiliza como fuente de carbono para la formación del micelio.

Realiza Moyer (1953) una serie de experiencias para ver si existe correlación entre el pH inicial del medio y la concentración de metanol necesaria para estimular la producción de ácido cítrico. Encuentra que el pH tiene poco efecto en el aumento de formación de ácido cítrico o en la disminución de la esporulación. Encuentra que la acción estimulante del metanol es más marcada en un pH situado entre: 1.95-3.1. Si se baja el pH inicial, se necesita menos metanol.

Se puede considerar que la presencia de alcohol y la baja acidez inicial, alteran el metabolismo normal de los azúcares hacia una mayor acumulación de ácido cítrico.

Moyer (1954) patenta el proceso anterior de adición de alcoholes al medio de producción de ácidos orgánicos, incluyendo: metanol, propanol, metil-acetato, etil-acetato y otros.

METODOS

Los métodos utilizados en este trabajo, también van incluídos en dos apartados, uno en relación con el hongo y los medios de conservación y desarrollo; otro, el relacionado con la toma de muestras y los análisis que en ellas se realizan.

Empleamos en este trabajo una raza de *Aspergillus niger* 72-4 Wis. (13), aislada por selección natural en trabajo anterior de Malo & Regueiro (1957). Sus métodos de conservación, medio de esporulación, medio basal de fermentación y técnicas de fermentación, son las mismas de trabajos anteriores. Como resultado de otro trabajo de Malo & Regueiro (1958), al medio basal se añade veinticinco gammas de zinc por cada 100 c. c. de medio. Las adiciones de alcoholes se realizan después de la esterilización y posteriormente se hace la inoculación de esporas del hongo.

La toma de muestras se hace por métodos señalados en trabajos anteriores. Las determinaciones que se realizan son las siguientes: pH con Beckman modelo G; azúcar remanente por método Shaffer & Somogyi (1933); acidez titulable, por método de Karow & Waksman (1947); ácido cítrico, por método Perlman & Lardy & Johnson (1944).

La determinación colorimétrica de ácido cítrico, se hace sólo en ocasiones, pues cuantas veces se ha realizado, sus valores correspondían con los de la acidez titulable, lo cual significaba que el único ácido producido en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio es el ácido cítrico.

El peso de micelio se hace por desecación a 100° a peso constante.

RESULTADOS

Las experiencias que realizamos para estudiar la influencia que los alcoholes tienen sobre la producción de ácido cítrico por fermentación en superficie de un medio sintético por un mutante de *Aspergillus niger*,

las podemos dividir en dos grupos: uno en que se estudia la influencia de diferentes alcoholes (metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol) y otro en que se estudian factores en relación con la influencia del metanol (agua, metales, "corn steep", extracto de levadura, pH).

En todos los casos y derivado de trabajos anteriores, se utiliza el medio basal al que se añade veinticinco gammas de zinc por 100 c. c. de medio. Las adiciones de alcoholes se realizan después de la esterilización y una vez frío el medio, para evitar la evaporación de los mismos. Las demás condiciones de fermentación son las indicadas en los métodos.

Influencia del metanol.

Se adicionan al medio cantidades entre 1-5 % de metanol, y a los dos días se observa crecimiento en todos los matraces, pero menos a medida que aumenta la cantidad de metanol; así en el que tiene un 5 %, el crecimiento es nulo. A los cuatro días, la esporulación es completa en el primer matraz y nula en el quinto. A los seis días aparece pigmento amarillo en los dos últimos matraces, que aun no esporulan. Estas características se mantienen hasta el último día, aun cuando en el cuarto matraz aparece algo de esporulación.

Es decir, que en cuanto a los caracteres morfológicos, el metanol frena el crecimiento y la esporulación y da lugar a la aparición de un pigmento amarillo cuando pasa de un 4 % en el medio.

En cuanto a la producción de micelio, utilización de azúcar y formación de ácido cítrico, se puede ver la gráfica núm. 1.

Observamos que la producción de micelio disminuye a medida que aumenta la cantidad de metanol. La utilización de azúcar varía poco, aunque parece que también el aumento de metanol retrasa este consumo. En cuanto a la formación de ácido cítrico, se observa una producción máxima (54,7 % de conversión) a una concentración del 3 % de metanol.

Influencia del etanol.

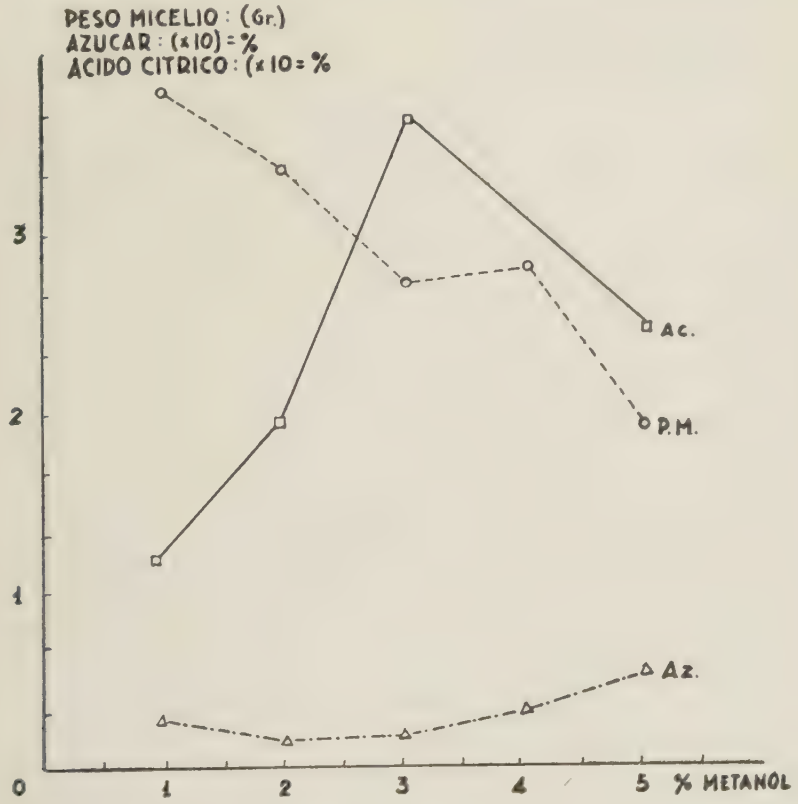
Se adicionan al medio cantidades de etanol, entre 1-5 % , y a los dos días se observa un crecimiento escaso, que disminuye a medida que aumenta la cantidad de metanol. A los cuatro días aumenta la consistencia

de micelio en todos los matraces, apareciendo esporulación en los tres primeros. A los seis días todos los matraces están esporulados, a excepción del quinto, que presenta un pigmento amarillo. Al final todos se presentan esporulados.

Es decir, que en cuanto a los caracteres morfológicos, el etanol no actúa como el metanol, aun cuando durante el crecimiento se observan diferencias.

En cuanto a los demás caracteres puede observarse la gráfica número 2.

En producción de micelio, las variaciones son muy escasas. El pH varía de 1.6 a 2.2 a medida que aumenta la cantidad de alcohol. No se observan variaciones en el consumo de azúcar. La formación de ácido



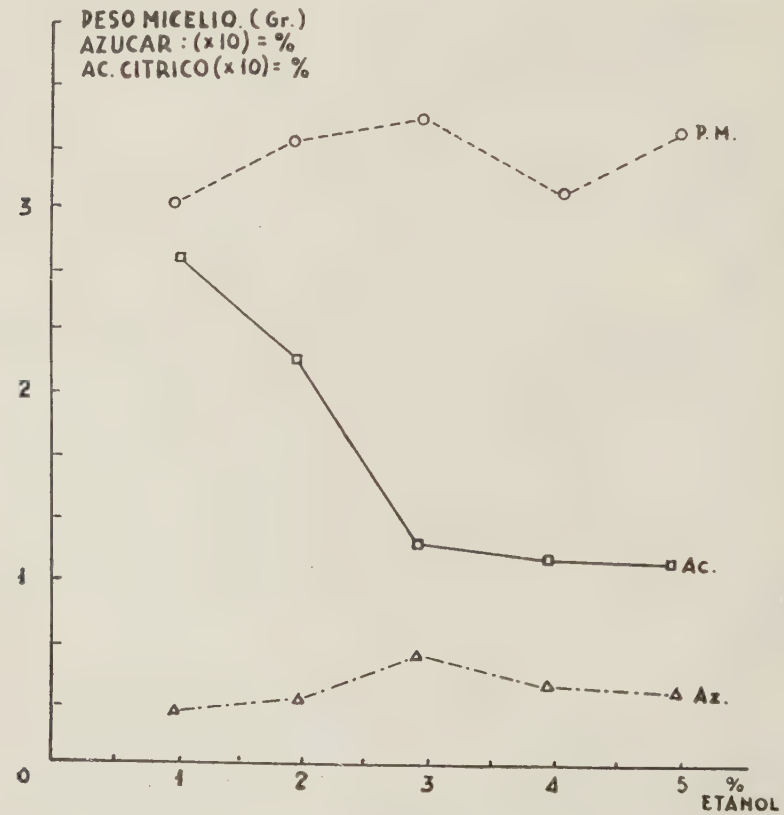
Gráfica 1.

cítrico, disminuye progresivamente a medida que aumenta la cantidad de alcohol.

Influencia del propanol.

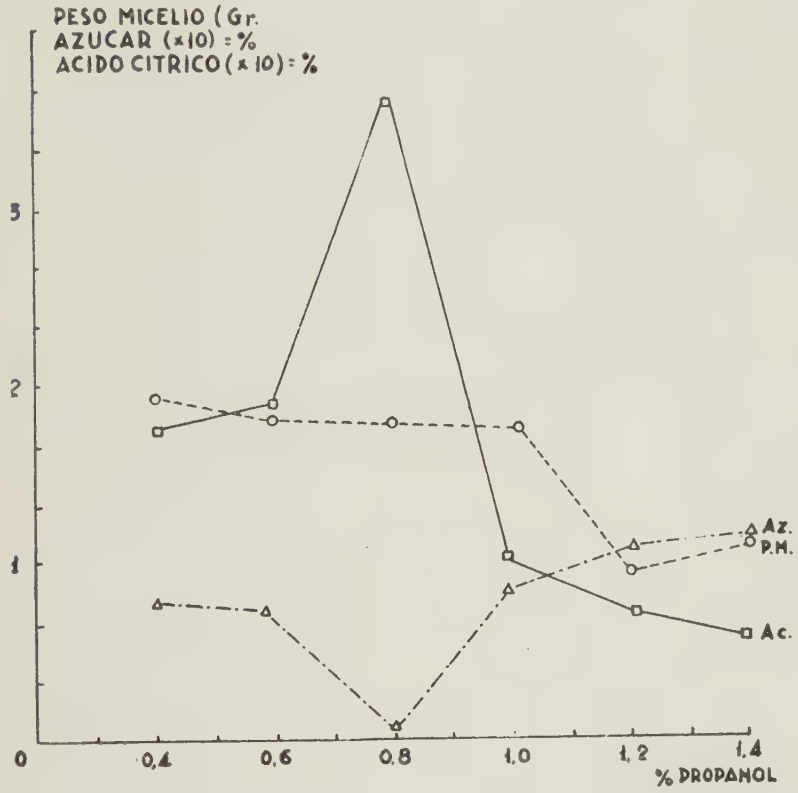
Se adicionan al medio cantidades de propanol entre: 0,4-1,4 %, debido a la mayor toxicidad de este alcohol. En las características morfológicas, se observa que el crecimiento disminuye a medida que aumenta la cantidad de alcohol y al final, la esporulación es abundante en los dos primeros matraces y muy escasa en los demás.

En relación con los demás caracteres de la fermentación, podemos ver la gráfica núm. 3.



Gráfica 2.

La formación de micelio se inhibe ligeramente a medida que aumenta la cantidad de alcohol. En la utilización de azúcar, aumenta su consumo hasta una cantidad de 0,8 % de propanol, disminuyendo después progresivamente dicho consumo. En cuanto a la producción de ácido cítrico, también aumenta ésta hasta una concentración de 0,8 % de propanol (36,4 % de conversión), disminuyendo después rápidamente.



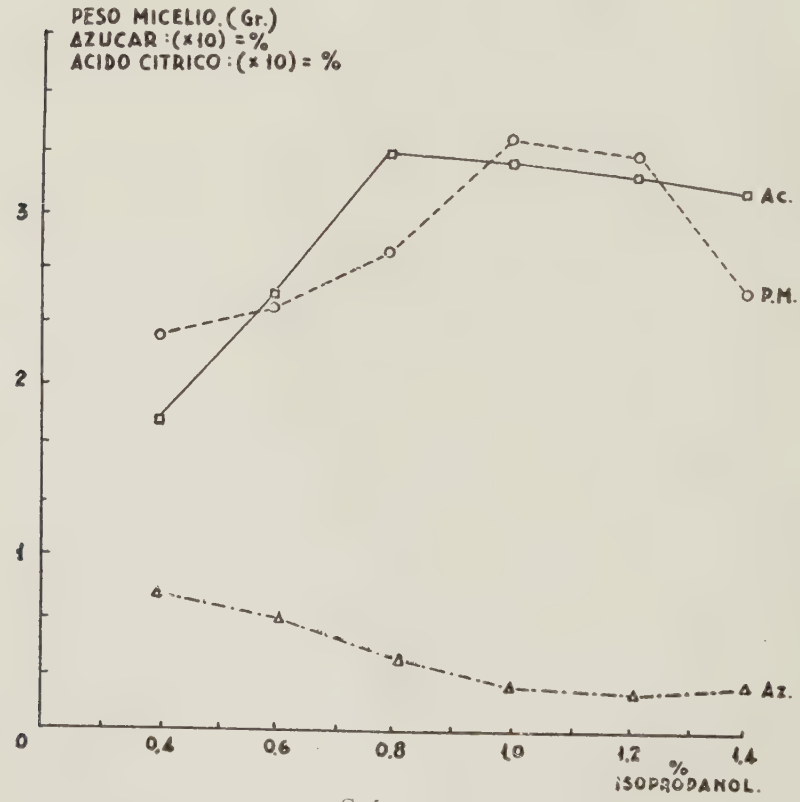
Gráfica 3.

Influencia del isopropanol.

Se adicionan al medio cantidades de isopropanol entre 0,4-1,4 %, por las razones que hemos señalado en el propanol. En las características morfológicas, se observa disminución de crecimiento a medida que aumenta la cantidad de alcohol; también ocurre lo mismo con la esporulación.

En relación con los demás caracteres, podemos observar la gráfica número 4.

La formación de micelio aumenta ligeramente entre 1,0-1,2 % de alcohol. La utilización de azúcar aumenta ligeramente a medida que aumenta la cantidad de alcohol. En cuanto a la producción de ácido cítrico, aumenta hasta un 0,8 % de alcohol, manteniéndose después sin disminuir apreciablemente.

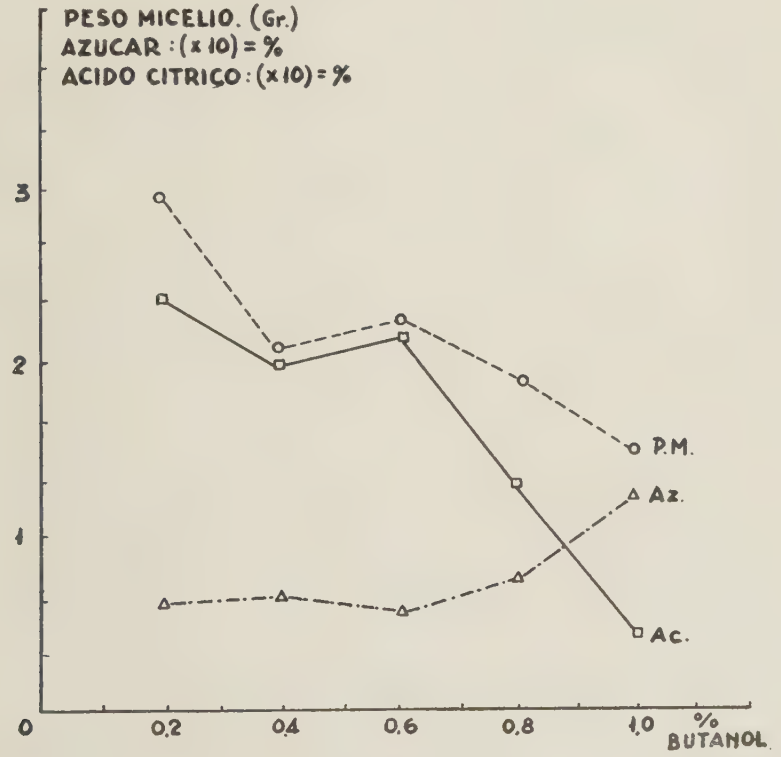


Gráfica 4.

Influencia del butanol.

Por iguales razones que en el caso anterior, se adicionan al medio cantidades de butanol entre 0,2-1,0 %. A los dos días, el crecimiento es bueno en el primer matraz, escaso en el segundo y nulo en los demás. A los siete días, hay micelio en todos y comienza a esporular el primero; así continúa hasta el final, aunque la esporulación del primero se torna verdosa e irregular. Las demás características pueden verse en la gráfica núm. 5.

El pH varía de 1.75 a 2.05 a medida que aumenta el alcohol. Esa producción de micelio disminuye progresivamente y la utilización de azúcar también disminuye, así como también la formación de ácido cítrico, a medida que aumenta la cantidad de alcohol.



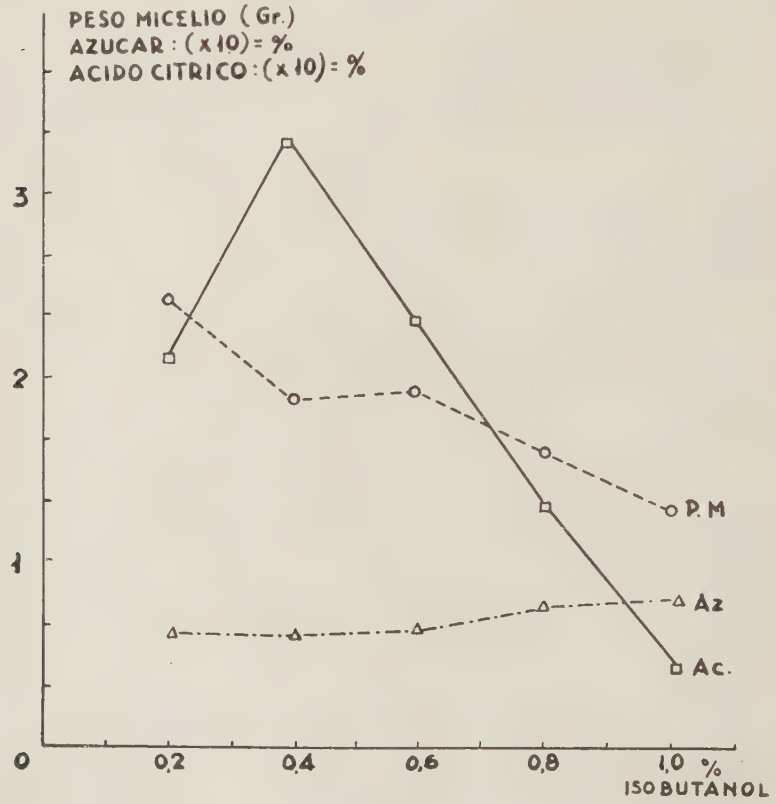
Gráfica 5.

Influencia del isobutanol.

Por iguales razones que en el caso anterior, se adicionan al medio cantidades de isobutanol entre 0,2-1,0 %. Las características morfológicas son idénticas que en el caso del butanol.

Con relación a los demás caracteres de la fermentación, puede observarse la gráfica núm. 6.

El pH varía de 1.85 a 2.10 a medida que aumenta el alcohol. La producción de micelio y la utilización de azúcar, disminuyen progresivamente a medida que aumenta el alcohol en el medio. En cuanto a la formación de ácido cítrico, aumenta hasta un 0,4 % de alcohol y después disminuye rápidamente.



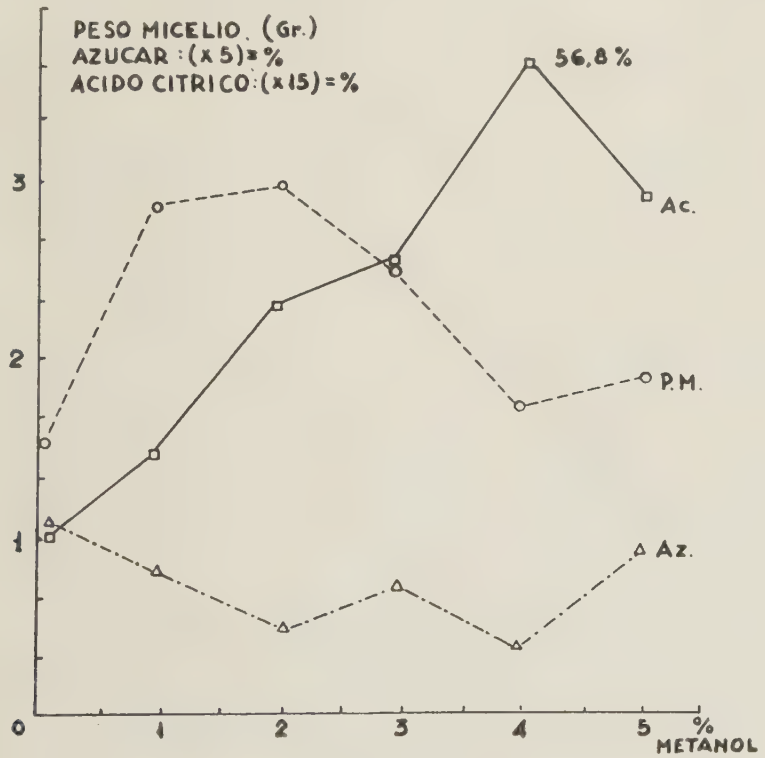
Gráfica 6.

Influencia del metanol en medio con agua corriente.

De los seis alcoholes probados, observamos que el metanol es el que mejores resultados produce en la fermentación cítrica. Por esta razón interesa el estudiar factores en relación a su presencia.

La primera experiencia está realizada con agua destilada, por lo cual interesa conocer si la preparación del medio con agua corriente influía en los resultados. Esto es lo que se hace aquí, poniendo matraces con 0,0-5,0 % de metanol. Al final están esporulados los dos primeros matraces, con indiciones el tercero y nada los demás. Los demás caracteres pueden verse en la gráfica núm. 7.

La producción de micelio tiene un óptimo entre un 1-2 % de metanol y la utilización de azúcar sensiblemente no varía. En cuanto a la producción de ácido cítrico, éste aumenta hasta una concentración de metanol del 4 % (56,8 % de conversión) y luego disminuye. Esto quiere



Gráfica 7.

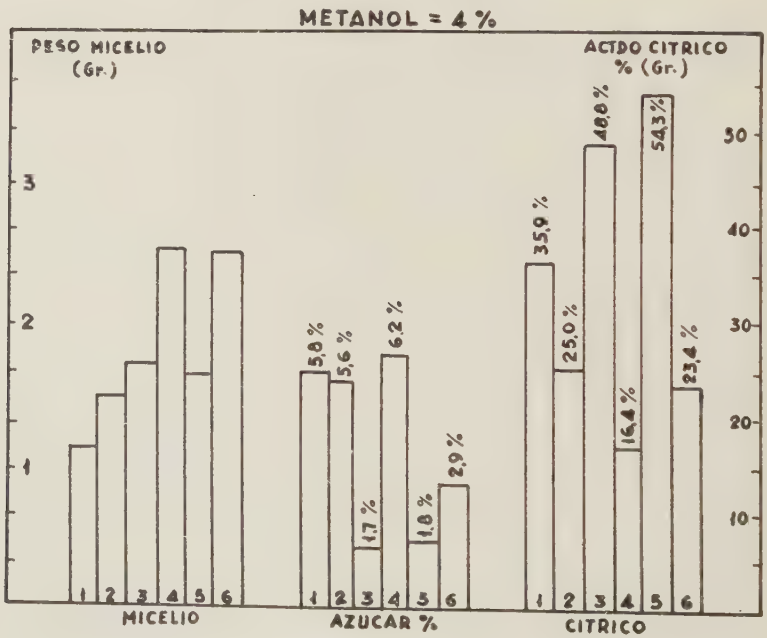
decir que se produce la misma cantidad de ácido cítrico que en agua destilada, pero se necesita más metanol, para obtener el mismo rendimiento.

Influencia del metanol en ausencia de iones metálicos.

En medio basal, con agua destilada, con un 4 % de metanol, se prueba la influencia de la ausencia de iones metálicos, según el cuadro:

Matraz	Zinc	Cobre	Hierro	Manganeso
1	—	—	—	—
2	—	6	130	10
3	25	—	130	10
4	25	6	—	10
5	25	6	130	—
6	25	6	130	10

Estos son γ/100 c. c. de medio. La gráfica de los resultados es la número 8.



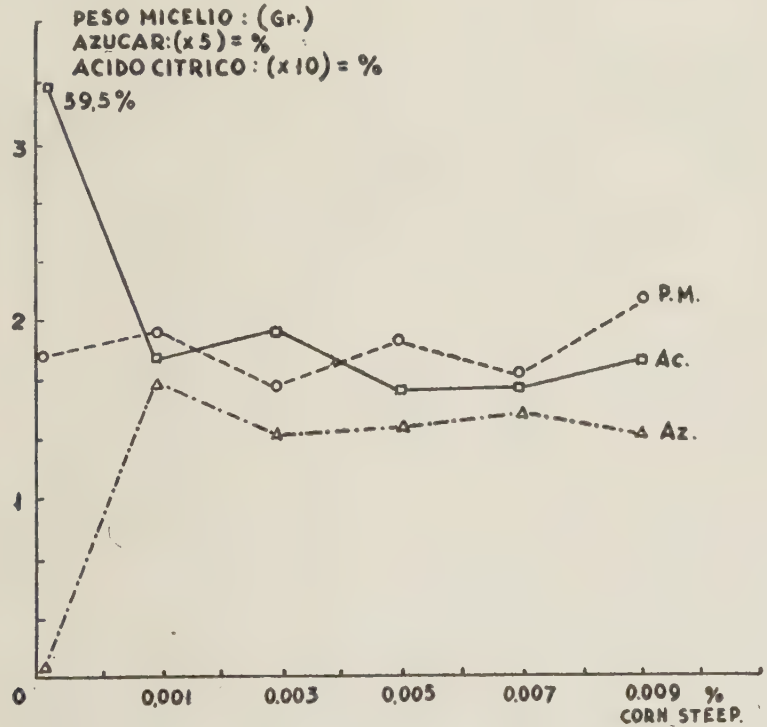
Gráfica 8.

Hasta el final de la fermentación, los matraces 1, 2, 4, presentan un pigmento amarillo; los 3 y 5 presentan el micelio blanco, y el 6 aparece esporulado. Es decir, que la falta de zinc, hierro o todos los metales, da lugar a la aparición del pigmento amarillo, y la falta de cobre y manganeso impide la esporulación. Unicamente el que tienen todos los metales, puede esporular.

En cuanto a la producción de micelio, éste aumenta con la falta de hierro o presencia de todos los metales; la falta de zinc o de todos los metales disminuye mucho la cantidad de micelio.

Sobre la utilización de azúcar, la falta de cobre o de manganeso aumenta mucho dicho consumo, y menos, la presencia de todos los metales.

En cuanto a la producción de ácido cítrico, la falta de manganeso o de cobre aumenta en gran manera su formación, que baja bastante cuando falta hierro.



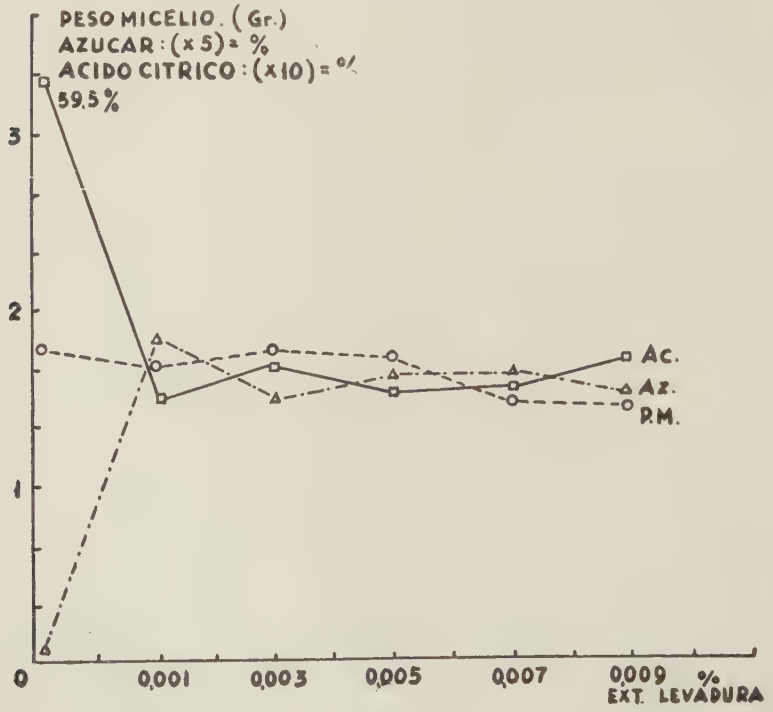
Gráfica 9.

Influencia del metanol en presencia de "corn steep".

En medio basal, con agua destilada, con 4 % de metanol, se añaden diferentes cantidades de "corn steep": 0,000-0,009 %. Da la gráfica número 9.

A los dos días, hay buen crecimiento en todos los matraces y el micelio es tanto más arrugado cuanto más "corn steep" se ha añadido, siendo todos de color blanco. A los tres días aparecen los micelios sumergidos. Al cuarto día comienza nuevo crecimiento, con pigmento amarillo que aumenta a medida que aumenta la cantidad de "corn steep". Al quinto día comienza la esporulación, aunque no completa, que se mantiene hasta el final.

Parece que el "corn steep" suprime el efecto del metanol, pues aunque parece que no influye en la producción de micelio, disminuye la utilización del azúcar y la formación de micelio a una tercera parte.



Gráfica 10.

Influencia del metanol en presencia de extracto de levadura.

En iguales condiciones que la experiencia anterior, se añaden extractos de levadura: 0,000-0,009 %. Da la gráfica núm. 10.

A los dos días hay un crecimiento abundante y tanto mayor cuanto más extracto de levadura se ha añadido. A los tres días los micelios aparecen sumergidos. Al cuarto día comienza un nuevo desarrollo, pero esta vez el micelio aparece con pigmento amarillo y de forma irregular. A los cinco días comienza la esporulación en todos los matraces, aunque no completamente. Así se mantiene hasta el final.

Lo mismo que en el caso del "corn steep", el extracto de levadura parece que suprime el efecto del metanol, pues aunque parece que no influye en la producción de micelio, disminuye la utilización de azúcar y la formación de micelio a una tercera parte.

Influencia del metanol en relación al pH.

La influencia que diferentes cantidades de metanol pueden ejercer sobre la producción de ácido cítrico por fermentación de medio sintético en superficie, puede variar mucho, según el pH inicial del medio. Esto es lo que tratamos de estudiar en esta última experiencia. El cuadro de la experiencia es el siguiente:

	pH					
	3.1	2.5	1.9	1.7	1.5	1.4
	POR CIENTO					
Matraz 1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
— 2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
— 3	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
— 4	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
— 5	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
— 6	5,0	5,0	5,0	5,0	5 0	5,0

En relación con las características morfológicas, a medida que aumenta la acidez, el crecimiento parece que se retrasa muy ligeramente,

en cambio va desapareciendo la esporulación. Al final de la fermentación las diferencias son casi imperceptibles.

Los resultados obtenidos en los demás caracteres son los siguientes:

Matraz	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	% conversión
pH : 3.1:					
1	1.75	2,590 gr.	7,00 %	2.238 mgr.	15,9 %
2	2.00	2.950 "	4,80 %	2.290 "	16,3 %
3	1.75	2,870 "	2,70 %	5.362 "	38,3 %
4	1.85	1,980 "	5,20 %	3.123 "	22,3 %
5	1.90	3,123 "	7,40 %	3.123 "	22,3 %
6	1.50	1,300 "	5,10 %	7,288 "	52,0 %
pH : 2.5:					
1	1.70	2,670 gr.	4,70 %	2.655 mgr.	18,9 %
2	2.00	2,930 "	5,00 %	2.551 "	18,2 %
3	1.55	3,090 "	1,80 %	5.622 "	40,1 %
4	1.70	2,250 "	3,40 %	4.946 "	35,3 %
5	1.70	1.860 "	4,00 %	6.455 "	46,1 %
6	1.50	1,360 "	4,90 %	6.768 "	48,3 %
pH : 1.9:					
1	1.55	1,850 gr.	5,30 %	3.956 mgr.	28,2 %
2	1.60	2,620 "	3,10 %	3.175 "	22,6 %
3	1.55	1,810 "	3,00 %	6.143 "	43,8 %
4	1.65	1,470 "	6,00 %	3.644 "	26,0 %
5	1.45	1,370 "	2,70 %	9.371 "	66,9 %
6	1.55	1,270 "	6,10 %	4.737 "	33,8 %
pH : 1.7:					
1	1.45	2,900 gr.	3,90 %	1.916 mgr.	13,6 %
2	1.50	3,080 "	3,50 %	1.916 "	13,6 %
3	1.20	3,290 "	2,10 %	4.435 "	31,6 %
4	1.50	2,140 "	5,20 %	2.135 "	15,2 %
5	1.40	1,700 "	5,40 %	3.504 "	25,0 %
6	1.10	1,550 "	1,80 %	9,200 "	65,7 %

Matraz	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	% conversión
pH : 1.5:					
1	1.65	3,230 gr.	2,90 %	2.026 mgr.	14,4 %
2	1.30	3,140 "	3,50 %	2.518 "	17,9 %
3	1.10	3,750 "	2,10 %	4.107 "	29,3 %
4	1.40	2,370 "	4,80 %	2.628 "	18,7 %
5	1.20	1,970 "	4,40 %	4.599 "	32,8 %
6	1,00	1.450 "	3,20 %	7.118 "	50,8 %
pH : 1.4:					
1	1,20	2,580 gr.	4,10 %	2.354 mgr.	16,8 %
2	1.00	2,770 "	2,80 %	2.737 "	19,5 %
3	0,95	3,650 "	2,70 %	2.902 "	20,7 %
4	1.20	2,020 "	5,80 %	2.190 "	15,6 %
5	1.20	1,880 "	5,00 %	2.847 "	20,3 %
6	1.15	1.270 "	7,70 %	2,572 "	18,3 %

A pH : 3.1 : no se encuentran muchas variaciones en cuanto a la producción de micelio y la utilización de azúcar, aunque el primero parece disminuir a medida que aumenta la cantidad de metanol. La formación de ácido cítrico parece que aumenta, llegando a ser máxima a un 5 % de metanol (52,0 % de conversión).

A pH : 2.5 : al final, el pH no parece estar en relación con la cantidad de metanol. El micelio tiende a disminuir a medida que aumenta la cantidad de alcohol. La utilización de azúcar es parecida, con un óptimo al 2 % de metanol. La producción de ácido cítrico es, en general, mayor que al pH inicial anterior, aunque el óptimo es menor (48,3 % de conversión).

A pH : 1.9 : el pH final es parecido. La producción de micelio va disminuyendo a medida que aumenta la cantidad de metanol, siendo menor que a pH iniciales más elevados. La utilización de azúcar es parecida en todos. La formación de ácido cítrico tiene un óptimo a 4 % de metanol (66,9 % de conversión).

A pH : 1.7 : los pH finales son más bajos que en los casos anteriores.

El micelio disminuye a medida que sube el metanol, siendo mayores que en el pH anterior. La utilización de azúcar parece que no guarda relación con la concentración de alcohol. En cuanto a la formación de ácido cítrico, es máxima a una concentración de metanol de 5 % (65,7 % de conversión).

A pH : 1.5 %: el pH final parece ser más bajo a medida que sube la concentración de metanol. El micelio a su vez también va disminuyendo a medida que se adiciona más alcohol. La utilización de azúcar es semejante en todos los casos. La formación de ácido cítrico aumenta a medida que sube el metanol, teniendo un óptimo a un 5 % del alcohol (50,8 % de conversión).

A pH : 1.4: los pH finales son bastante bajos y sin relación con la cantidad de metanol (llega a menos de pH : 1.0). La cantidad de micelio baja a medida que sube la concentración de metanol, siendo menor que a pH inicial más elevado. La utilización de azúcar es parecido en todos, aunque baja a medida que sube la cantidad de alcohol. Con relación a la formación de ácido cítrico, es parecida en todos y menor que en casos anteriores; la máxima es a un 2 % de metanol (20,7 % de conversión).

En resumen, parece existir una cierta correlación entre el pH inicial y la formación de ácido cítrico en presencia de metanol, pues el máximo de producción se realiza a pH entre 1.9-1.7.

DISCUSION

Estudia Moyer (1953) la influencia del metanol, etanol e isopropanol en la producción de ácido cítrico por fermentación. Nosotros probamos la acción del metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol. En todos los casos, el aumento de la cantidad de alcohol da lugar a una disminución del crecimiento y la esporulación, a excepción del etanol, en que en todos los casos esporula. Esto va de acuerdo con las experiencias de otros autores, que dicen que el etanol es utilizado por el hongo como fuente de carbono, lo cual no ocurre con los demás alcoholes.

En todos los casos observamos una disminución en el peso de micelio a medida que aumenta la concentración de alcohol; solamente cuando se añade etanol, el peso de micelio no varía, y cuando se añade isopropanol, aumenta dentro de ciertos límites, muy bajos. Esto puede indicar tam-

bién una cierta utilización como fuente de carbono, como en el caso del etanol.

Con relación al consumo de azúcar, el metanol, propanol, butanol e isopropanol, retrasan el mismo; el etanol no afecta a dicho consumo, y el isopropanol lo aumenta ligeramente, lo que se corresponde con el mayor aumento en la cantidad de micelio.

En cuanto a la producción de ácido cítrico, podemos esquematizar el cuadro siguiente, con los rendimientos óptimos, según la concentración de alcohol:

ALCOHOL	Concentración	Acido cítrico
—	—	15,0 %
Metanol	3,0 %	54,7 %
Etanol	1,0 %	39,8 %
Propanol	0,8 %	36,4 %
Isopropanol	0,8 %	32,7 %
Butanol	0,2 %	22,7 %
Isobutanol	0,4 %	32,0 %

De estos resultados se deduce que únicamente el metanol produce una cantidad de ácido cítrico que puede considerarse rentable (se considera así, cuando se produce más de un 50 % de conversión). Por esta razón se fijan una serie de experiencias para estudiar otros factores que pueden influir sobre la acción del metanol.

Cuando se prueba la acción del metanol en un medio basal preparado con agua corriente se observa también una producción máxima con un 4 % de alcohol (56,8 % de conversión), lo que quiere significar que el metanol permite la presencia de iones metálicos, impidiendo la acción de éstos sobre la fermentación.

Se prueba entonces si existe alguna acción específica entre metanol y metales, y en otra experiencia encontramos que la presencia de alguno de los metales da lugar a una mayor cantidad de micelio. La falta de cobre o manganeso produce un mayor consumo de azúcar y una mayor producción de ácido cítrico.

Moyer (1953) añade a su medio basal una pequeña cantidad de

"corn steep"; nosotros probamos la influencia de éste y de extracto de levadura y encontramos que estas sustancias suprimen el efecto del metanol, que es un efecto tóxico, en cuanto a la utilización del azúcar y la formación de ácido cítrico, no influyendo en la cantidad de micelio producido. Un efecto que se produce en ambos casos es que el primer micelio que se desarrolla, al tercer día, se sumerge, y entonces vuelve a producirse otro crecimiento normal.

Estudiando la posible relación entre la cantidad de metanol y el grado de acidez o pH inicial del medio, encontramos que el cuadro de relaciones se puede establecer así, según la formación de ácido cítrico.

pH	Metanol	Acido cítrico
3.1	5 %	52,0 %
2.5	5 %	48,3 %
1.9	4 %	66,9 %
1.7	5 %	65,7 %
1.5	5 %	50,8 %
1.4	2 %	20,7 %

De aquí parece deducirse una conveniencia de un pH inicial de 1.7-1.9 y de un 5 % de metanol. En general la producción de micelio disminuye con la cantidad de metanol y con el aumento de acidez. Moyer (1953) encuentra que el pH óptimo, en las condiciones que él utiliza, está entre 1.95-3.1.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la influencia de alcoholes de bajo peso molecular, en la producción de ácido cítrico en un medio sintético, por fermentación en superficie y por una raza de *Aspergillus niger* obtenida por selección natural en este laboratorio.

Se prueban los alcoholes: metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol, encontrándose que el que produce mejor efecto es el metanol, que baja la producción de micelio, disminuye el consumo de azúcar, frena el crecimiento y la esporulación, pero da lugar a una mayor formación de ácido cítrico.

El metanol, tanto en agua destilada como en agua corriente, da una producción máxima a una concentración del 4 % (56,8 % de conversión), Si en el medio falta cobre o manganeso, aumenta los rendimientos. No es conveniente la adición de "corn steep" o de extracto de levadura.

Viendo la relación entre concentración de metanol y pH inicial del medio, se encuentra que un 5 % de metanol y un pH inicial de 1.7-1.9 da los mejores resultados (65,7-66,9 % de conversión) en ácido cítrico.

SUMMARY

In this paper we study the influence of alcohols of a low molecular weight, on the production of citric acid in a synthetic medium by surface fermentation and by a breed of *Aspergillus niger* obtained by natural selection in this laboratory.

We tried the alcohols: methanol, ethanol, propanol, isopropanol, butanol and isobutanol, and found that the one producing the best effect is metanol which lowers the production of mycelium, reduces the consumption of sugar, restrains growth and sporulation but gives rise to higher formation of citric acid.

Methanol both, in distilled water and common water, gives the best production at a concentration of 4 % (56,8 % of conversión). If the medium lacks copper or manganese, the outputs increase. The addition of corn steep or yeast extract is not convenient.

On studying the relation between methanol concentration and the initial pH of the medium we find that a 50 % of methanol and an initial pH of 1.7-1.9 gives the best results (65.7-66.9 % conversion) in citric acid.

BIBLIOGRAFIA

J. F. Clark. 1899. Botan. Gaz. XXVIII. 289 y 378.

J. W. Foster. 1949. Chemical Activities of Fungi. Academic Press.

E. O. Karow & S. A. Waksman. 1947. Ind. Eng. Chem. 39. 821.

J. L. Malo Echevarría & B. Regueiro Varela. 1957. Microbiol. Española. 10. 425.

J. L. Malo Echevarría & B. Regueiro Varela. 1958. Microbiol Española.

A. J. Moyer. 1953. Appl. Microbiol. I. I.

A. J. Moyer. 1954. U. S. Patent. 2.674.561.

D. Perlman & H. A. Lardy & M. J. Johnson 1944. Ind. Eng. Chem. 36. 515.

Shaffer & Somogyi. 1942. "Polarimetry, Sacharimetry of Sugars". Pág. 196.

C. S. I. C.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
DEL PATRONATO «JUAN DE LA CIERVA»

LOS BLASTOMICETOS EN LAS SIDRAS DE ASTURIAS

POR

B. IÑIGO y D. VAZQUEZ

A finales del pasado siglo, se iniciaron las investigaciones sobre la flora blastomicética de algunas frutas y se demostró su intervención en la fermentación de los mostos. Fue Pasteur (1) el primero en observar la existencia de levaduras en la superficie de la uva madura y su ausencia cuando estaba todavía verde. Hansen realizó el primer trabajo interesante sobre la existencia de *Kloeckera apiculata* en fresas, cerezas, grosellas y uvas maduras (2), y posteriormente refiere el aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pastorianus y Saccharomyces ellipsoideus* de mosto de uva (3).

Con posterioridad, en diversos países aparecieron otros trabajos relacionados con el estudio de levaduras de fruta, siendo uno de los más recientes el llevado a cabo por B. Iñigo en Perugia (Italia), que consideró un elevado número de frutas y aisló de la manzana procedente de la región umbra las especies: *Kloeckera apiculata, Candida krusei, Candida humícola* y *Rhodotorula mucilaginosa* (4).

Pero el primer trabajo llevado a cabo sobre blastomicetos de sidras fue realizado en Francia por Kayser (5), que da cuenta del aislamiento del *Saccharomyces apiculatus* (actualmente *Kloeckera apiculata*) y *Saccharomyces mali* de una sidra en fermentación; posteriormente, el mismo Kayser aisló levaduras de las mejores sidras presentadas a una exposición y también Dienert estudió las levaduras de algunas sidras francesas. En Inglaterra, en Long Ashton (Bristol), a principios de siglo, Lloyd, Barker y Pearce (6, 7, 8), aislaron algunas levaduras de

sidras en fermentación y realizaron algunas fermentaciones en pureza con levaduras seleccionadas; posteriormente Barker hizo otros trabajos (9, 10, 11), mereciendo especial mención el último de ellos, en el que estudia la flora blastomicética de las sidras de Kingston Black, para lo que tomó seis muestras de mosto y realizó aislamientos a los siete y a los veintiséis días de tomadas. Llega a la conclusión de que en las fermentaciones estudiadas no hay una especie determinada dominante, ya que aisla once tipos de levaduras en la primera fase, doce en la segunda y otras doce en la sidra ya embotellada. Distingue en la sidra tres períodos en los que predominan levaduras distintas, ya que al comienzo de la fermentación predominan levaduras apiculadas; durante la fase media de la misma, levaduras de alto poder fermentativo, y en el tercer período, que se refiere a la sidra ya embotellada, predominan Tórulas y otras levaduras que no fermentan el mosto. Barker no clasificó las distintas cepas aisladas, por lo cual este trabajo tiene poco interés taxonómico.

Pero en los mostos de manzana aun no se han llevado a cabo investigaciones sistemáticas similares a las iniciadas en Italia por De Rossi (12) y Castelli (13) con mostos de uva y seguidos en aquel país, Francia y Yugoslavia, por diversos investigadores, y en España, por Castelli e Iñigo (14, 15), trabajando también con mosto de uva. De Rossi tomó en consideración los mostos de Umbría, recogiendo muestras en diversas localidades de la citada región, realizando aislamientos antes de comenzar la fermentación, durante la fermentación tumultuosa y al final de la misma, realizando un estudio detallado de cada cepa aislada hasta llegar a la identificación de la misma. Siguiendo la técnica establecida en el Instituto de Microbiología Agraria y Técnica de la Universidad de Perugia (16), pretendemos llevar a cabo el estudio de los agentes de la fermentación del mosto de manzana en las distintas regiones españolas productoras de sidra, y para ello hemos comenzado con este trabajo, en el cual se presentan los resultados obtenidos en el análisis micobriológico de doce mostos tomados en distintas localidades de Asturias, en la campaña de 1957.

Hemos iniciado estos estudios en la región asturiana, por la gran importancia que en ella tiene la industria sidrera, a la cual se destina normalmente unos 50.000.000 de kilos de manzana que producen aproximadamente 28.000.000 de litros de sidra natural y 7.000.000 de litros

de sidra achampanada. Acapara esta región el 65 % de la producción nacional de sidra.

Asturias es una región muy montañosa, con clima, vegetación y formaciones geológicas muy variadas, lo cual da lugar a una gran variedad de tipos de suelo, siendo rendsinas y tierras pardas las que corresponden a la mayor parte de las pomaradas; están situadas éstas a lo largo de la costa y hacia el interior, hasta una altitud de unos 300 metros, siendo la zona de mayor producción de sidra la comprendida en el triángulo geográfico Oviedo, Villaviciosa, Gijón, por lo cual todas las muestras se tomaron en esta zona (Quintana, Villa, Nava, Villaviciosa y Arroes). El clima correspondiente a esta parte de la provincia es húmedo, pero benigno, siendo la lluvia anual de unos 1.000 m/m., y las temperaturas máxima y mínima del año, de unos 30° C. y 0° C., respectivamente, con temperaturas medias de máximas y mínimas de 23° y 3° C.

En la actual campaña de 1958 estamos realizando el análisis microbiológico de mostos de manzana de la provincia de Guipúzcoa, para completar nuestro trabajo sobre la flora blastomicética de los mostos de manzana en España.

En Asturias se cultivan manzanas de variedades muy diversas (se calculan unas 2.000), muchas de las cuales se emplean para la elaboración de la sidra. Los mostos analizados fueron obtenidos a partir de manzanas de las variedades Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina. El tamaño de estas manzanas, es más bien pequeño, y el mosto obtenido partir de las mismas tiene una densidad que oscila de 1,035 a 1,055; azúcares totales de 90 a 110 por mil; ácido málico de 3,5 a 4,5 por mil; pH de 3 a 3,5 y sustancias pécticas de 1,30 a 1,60 por mil (17).

TECNICAS

1. *Toma de muestras y aislamiento de colonias.*

El trabajo fue iniciado con la toma de los mostos, recién elaborados, a la salida de la prensa. Se toman doce mostos, obtenidos a partir de manzanas recolectadas en diversas localidades de Asturias y que fueron examinadas en tres fases sucesivas: la primera cuando la fermentación todavía no se había iniciado; la segunda, a los seis días de la primera, y la

tercera, a los nueve días de la segunda, cuando la fermentación del mosto prácticamente había terminado. El análisis microbiológico fue iniciado, para cada mosto y fase, con el examen microscópico hecho sobre preparados coloreados con el líquido de Ziehl. Inmediatamente después se prepararon los cultivos de aislamiento por diseminación en gelatina-mosto, preparada al momento del uso, mezclando partes iguales de gelatina-agua al 20 % y mosto de manzana estéril. Las placas así preparadas se mantuvieron a 16°-18° C.; después de cuatro o cinco días se podían observar claramente las colonias desarrolladas.

Teniendo nuestro estudio un interés sustancialmente aplicativo, hemos procurado aislar las colonias que se presentaban en neta predominancia, ya que sólo a éstas se debe el proceso de fermentación de los mostos. A tal fin, se hizo necesaria la obtención de preparados por impresión de los cultivos en gelatina mosto, hecho siempre sobre la primera placa de las tres preparadas para cada fase, para lo cual se deposita un cubreobjetos sobre la placa, ejerciendo una ligera presión sobre aquél, separándolo cuidadosamente, dejándolo secar, fijando mediante el calor, y finalmente, haciendo una tinción con fucsina de Ziehl para realizar la observación microscópica.

Con los datos suministrados por la observación microscópica directa, los preparados por impresión y la observación de las colonias, pudimos establecer un criterio en la elección de las colonias dominantes.

De esta manera en cada fase del proceso fermentativo fueron aislados cinco cultivos, con lo que de cada mosto examinado se obtuvieron quince cultivos puros, y de los doce mostos examinados, un total de 180.

2. *Examen microscópico.*

La identificación de los cultivos puros se inicia con el examen microscópico de los cultivos sobre agar malta que nos proporciona los caracteres relativos a la forma y tamaño de las células; la observación se lleva a cabo sobre cultivos jóvenes de cuarenta y ocho horas. Se continúa con el examen microscópico de las levaduras desarrolladas en mosto de manzana estéril a las cuarenta y ocho horas, anotándose la forma, tamaño y agrupamientos celulares.

3. *Examen de las ramificaciones pseudomiceliares.*

Se realiza siguiendo la técnica de Rivalier-Seydel, que consiste en cultivar la levadura en un estrato delgado de agar-malta, colocado sobre un portaobjetos que se apoya en una varilla angular de vidrio, manteniéndose el cultivo durante siete días a 26° C., en ambiente húmedo y preservado de toda posible contaminación.

4. *Caracteres de los cultivos sobre agar-malta y mosto de manzana.*

Se efectúa la observación macroscópica de los cultivos en agar-malta a los sesenta días de sembrada la colonia, anotándose el aspecto de la pátina, color e intensidad del desarrollo, producción de pigmentos y cambios físicos en el medio de cultivo. La observación en mosto se realiza a los treinta días de la siembra, anotándose la existencia de fermentación, formación de depósito, turbidez o transparencia del mosto y aparición de anillos o velo superficial.

5. *Picadura en gelatina-mosto.*

Los cultivos por picadura en gelatina-mosto se mantienen en observación, a 18° C., durante cuarenta y cinco días, anotándose el desarrollo y eventual fluidificación de la masa.

6. *Esporificación.*

La presencia de esporas se observa en los cultivos viejos sobre agar-malta y sobre agar *Gorodkowa*. Si en estos medios no aparecen las ascas, se ensaya el método de Hansen, llevando el depósito de un cultivo de cuarenta y ocho horas en mosto de manzana sobre bloques de yeso colocados en placa Petri y en ambiente húmedo; a los cuatro días se inicia la observación microscópica y se continúa a intervalos de cinco días durante un mes.

7. *Fermentación de azúcares.*

Se realiza sobre un medio de cultivo a base de caldo común de carne adicionado del 2 % del azúcar en examen, colocado en tubo provisto de dispositivo Durham. Se mantiene en observación durante quince días por si hay fermentaciones tardías.

8. *Asimilación de nitratos.*

Se lleva a cabo sobre cultivos de la levadura en examen en terrenos sintéticos adicionados de nitrato potásico y convenientemente agarizado, confrontándose la pátina que desarrolla con un testigo desprovisto de nitrato.

9. *Desarrollo en presencia de alcohol etílico.*

Este ensayo se realiza sembrando la levadura en un medio de cultivo sintético adicionado de un 3 % de alcohol etílico como única fuente de carbono, manteniéndose el cultivo en observación durante treinta días, anotándose la eventual existencia de desarrollo.

10. *Escisión de la arbutina.*

Se observa cultivando la levadura en un medio de cultivo a base de extracto de levadura agarizado al 2 %, adicionado de 0,5 % de arbutina y unas gotas de solución de cloruro férrico. El resultado positivo se manifiesta por el cambio de color del agar, que pasa a tomar una tonalidad violácea.

11. *Asimilación de azúcares.*

Se observa el eventual desarrollo de la levadura en un medio agarizado, al que se agrega el 1 % del azúcar en examen.

12. *Poder fermentativo y acidez volátil.*

El primero se determina sobre una facción de fermentado en pureza, usando mosto de manzana estéril como terreno base, azucarado hasta 12° Baumé. En el mismo fermentado se determina la acidez volátil, que se expresa en gramos de ácido acético por litro.

ESPECIES AISLADAS

Para la clasificación de especies se han seguido las monografías de Guilliermond y el reciente sistema propuesto por Lodder y Kreger Van Rij (18, 19). Las especies halladas han sido las siguientes:

1. *Kloeckera apiculata* (Rees) Janke.
2. *Saccharomyces pastorianus* (Hansen).
3. *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch.
4. *Kloeckera magna* (de' Rossi) Janke.
5. *Saccharomyces fructuum* (Lodder y Kreger van Rij).
6. *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner.
7. *Saccharomyces chevalieri* (Guilliermond).
8. *Candida mycoderma* (Rees) Lodder y Kreger van Rij.
9. *Zigosaccharomyces florentinus* (Castelli).
10. *Saccharomyces ellipsoideus* (Hansen).
11. *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorgensen) Harrison.
12. *Candida utilis* (Hannèberg).
13. *Torulaspora rosei* (Guilliermond).

Seguidamente exponemos los cuadros 1-12 en los que se consignan sucesivamente el número de la muestra, localidad de procedencia de las manzanas, número progresivo de las cepas aisladas, poder fermentativo y acidez volátil de cada una de ellas al fermentar en pureza mosto de manzana azucarado estéril y diagnóstico. A continuación se da un juicio que resume el curso espontáneo de la fermentación en cada uno de los mostos examinados; en la penúltima columna se indica el lagar donde fue tomado el mosto y, finalmente, el grado alcohólico y acidez volátil de la muestra fermentada espontáneamente.

CUADRO 1

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
1	San Pedro de Ambás: 7 km. al sur de Villaviciosa.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	1	5	0,95	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finalizan *Saccharomyces fructuum* y *S. pastorianus.*	Sidra Orria de Quintana (Nava).	Alcohol: 4,45. Acidez volátil: 1,85.
				2	4,40	1,13	*Kloeckera apiculata.*			
				3	5,65	0,54	*Kloeckera apiculata.*			
				4	8,75	0,65	*Kloeckera apiculata.*			
				5	2,50	0,24	*Candida pulcherrima.*			
			II	6	5	0,77	*Kloeckera apiculata.*			
				7	4,40	0,83	*Kloeckera apiculata.*			
				8	6,25	0,95	*Kloeckera apiculata.*			
				9	8,75	0,65	*Kloeckera magna.*			
			III	10	5,65	0,77	*Candida pulcherrima.*			
				11	7,50	0,41	*Saccharomyces fructuum* ...			
				12	9,40	0,18	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				13	10	0,24	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				14	1,90	0,24	*Candida pulcherrima.*			
				15	5,65	0,89	*Kloeckera apiculata.*			

CUADRO 2

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
2	La Marina: 20 km. al este de Gijón	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	16	4,40	0,89	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y *Saccharomyces pastorianus.*	Sidra Ordóñez de Villa (Nava).	Alcohol: 5,80. Acidez volátil: 0,16.
			II	17	5	0,77	*Kloeckera apiculata.*			
				18	4,40	0,54	*Kloeckera apiculata.*			
				19	10	0,35	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				20	4,40	0,89	*Candida pulcherrima.*			
				21	6,90	0,89	*Kloeckera apiculata.*			
				22	5	0,59	*Kloeckera apiculata.*			
			III	23	10	0,29	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				24	9,40	0,12	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				25	10	0,12	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				26	10	0,24	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				27	10	0,29	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				28	10	0,18	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				29	—	0,13	*Cryptococcus laurentii...*			
				30	8,15	0,45	*Saccharomyces pastorianus* ...			

CUADRO 3

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil Gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
3	Santurio: 6 km. al oeste de Gijón, Villaviciosa. Miyares: 54 km. al este de Oviedo.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	31	5	1,13	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la continúan *Saccharomyces pastorianus* y *S. chevalieri.*	Sidra Sánchez de Nava.	Alcohol: 4. Acidez volátil: 2,45.
			II	32	4,40	0,89	*Kloeckera apiculata.*			
				33	4,40	1,01	*Kloeckera apiculata.*			
				34	10	0,12	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				35	4,40	0,95	*Candida pulcherrima.*			
				36	4.40	0,83	*Kloeckera apiculata.*			
				37	6,25	0,94	*Kloeckera apiculata.*			
				38	3,15	0,18	*Candida pulcherrima.*			
				39	8,75	0,29	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				40	1,25	0,18	*Candida pulcherrima.*			
			III	41	5	0,77	*Kloeckera apiculata.*			
				42	—	0,12	*Candida micoderma.*			
				43	8,15	1,01	*Saccharomyces chevalieri...* ...			
				44	—	0,18	*Candida micoderma.*			
				45	5	0,65	*Kloeckera apiculata.*			

CUADRO 4

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
4	Villaverde: 20 km. al este de Gijón. Cabranes: 10 km. al sur de Villaviciosa.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	46	5	0,83	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finalizan *Saccharomyces pastorianus* y *Zig. florentinus.*	Sidra El Sareganu de Nava.	Alcohol: 4,60. Acidez volátil: 1,63.
			II	47	5	0,89	*Kloeckera apiculata.*			
				48	4,40	0,83	*Kloeckera apiculata.*			
				49	5,65	0,83	*Kloeckera apiculata.*			
				50	1,25	0,18	*Candida pulcherrima.*			
				51	4,40	0,89	*Kloeckera apiculata.*			
				52	5	1,07	*Kloeckera apiculata.*			
				53	8,75	0,18	*Saccharomyces pastorianus* ...			
			III	54	5	0,83	*Kloeckera apiculata.*			
				55	2,50	0,12	*Candida pulcherrima.*			
				56	5	0,71	*Kloeckera apiculata.*			
				57	6,90	0,42	*Zigosaccharomyces florentinus*			
				58	5	0,77	*Kloeckera apiculata.*			
				59	5	0,65	*Kloeckera apiculata.*			
				60	8,75	0,29	*Saccharomyces pastorianus* ...			

CUADRO 5

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
5	Villaviciosa, Ribadesella: 38 km. al este de Villaviciosa.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	61	5	0,71	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finalizan *Saccharomyces pastorianus* y *S. ellipsoideus.*	Sidra Miravalles de Villaviciosa.	Alcohol: 5. Acidez volátil: 0,60.
62					4,40	0,95	*Kloeckera apiculata.*			
63					5	0,77	*Kloeckera apiculata.*			
64			II		6,90	0,59	*Saccharomyces pastorianus* ...			
65					1,25	0,12	*Candida pulcherrima.*			
66					5	0,83	*Kloeckera apiculata.*			
67					5	0,77	*Kloeckera apiculata.*			
68					10	0,29	*Saccharomyces pastorianus* ...			
69					10	0,18	*Saccharomyces pastorianus* ...			
70			III		3,75	0,84	*Candida pulcherrima.*			
71					3,75	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
72					7,50	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
73					9,40	0,32	*Saccharomyces ellipsoideus*...			
74					8,15	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
75					8,15	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			

CUADRO 6

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
9	Arriondas: 60 km. al este de Oviedo, Villaviciosa y Gijón.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	76	3,15	0,91	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finaliza *Saccharomyces pastorianus.*	Sidra M. Busto de Villaviciosa.	Alcohol: 5,60. Acidez volátil: 0,33.
				77	3,75	0,78	*Kloeckera apiculata.*			
				78	8,15	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
			II	79	3,15	0,19	*Candida pulcherrima.*			
				80	1,25	0,13	*Candida pulcherrima.*			
				81	3,15	0,58	*Kloeckera apiculata.*			
				82	3,15	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
			III	83	8,15	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				84	8,15	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				85	9,40	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				86	8,75	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				87	8,75	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				88	7,50	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				89	8,15	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				90	8,15	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			

CUADRO 7

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
7	Cabrales: 125 km. al este de Oviedo y Gijón.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	91	3,75	0,84	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finaliza *Saccharomyces pastorianus.*	Sidra Riera de Villaviciosa.	Alcohol: 5,10. Acidez volátil: 1,31.
			II	92	3,75	0,91	*Kloeckera apiculata.*			
				93	3,75	0,97	*Kloeckera apiculata.*			
				94	—	0,26	*Candida mycoderma.*			
				95	1,25	0,13	*Candida pulcherrima.*			
				96	4,40	0,97	*Kloeckera apiculata.*			
				97	8,15	0,92	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				98	8,75	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				99	8,15	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
			III	100	5	0,91	*Kloeckera apiculata.*			
				101	8,15	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				102	8,75	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				103	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				104	4,40	1,04	*Kloeckera apiculata.*			
				105	8,75	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			

CUADRO 8

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
8	Gijón, Villaviciosa.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	106	3,15	0,71	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finalizan *Kloeckera magna*, *S. ellipsoideus* y *S. pastorianus.*	Sidra Riera de Villaviciosa.	Alcohol: 4,50. Acidez volátil: 2,62.
				107	3,75	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
				108	3,75	0,97	*Kloeckera apiculata.*			
			II	109	—	0,45	*Rhodotorula mucilaginosa.* ...			
				110	3,15	0,78	*Candida pulcherrima.*			
				111	4,40	1,04	*Kloeckera apiculata.*			
				112	5	1,04	*Kloeckera apiculata.*			
				113	3,75	1,17	*Kloeckera apiculata.*			
				114	0,65	0,19	*Candida pulcherrima.*			
				115	3,75	0,78	*Candida pulcherrima.*			
			III	116	3,75	1,04	*Kloeckera apiculata.*			
				117	6,90	0,65	*Kloeckera magna.*			
				118	9,40	0,65	*Saccharomyces ellipsoideus*...			
				119	10	0,52	*Saccharomyces ellipsoideus*...			
				120	8,15	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			

CUADRO 9

N.º de muestra	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
6	Villaviciosa.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	121	3,75	0,91	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finaliza *Saccharomyces pastorianus.*	Sidra Busto Vega de Villaviciosa.	Alcohol: 4,80. Acidez volátil: 1,80.
			II	122	4,40	0,91	*Kloeckera apiculata.*			
				123	3,75	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
				124	6,90	0,39	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				125	3,75	1,10	*Candida pulcherrima.*			
				126	3,15	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
				127	5	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
				128	8,15	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				129	8,15	0,45	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				130	7,50	0,52	*Saccharomyces pastorianus* ...			
			III	131	4,40	1,36	*Kloeckera apiculata.*			
				132	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				133	5,65	1,17	*Kloeckera apiculata.*			
				134	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				135	5,65	0,45	*Kloeckera apiculata.*			

CUADRO 10

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
10	Onís: 100 km. al este de Oviedo y Villaviciosa.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	136	3,15	0,91	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finalizan *Saccharomyces pastorianus* y *Zig. florentinus.*	Sidra Busto Vega de Villaviciosa.	Alcohol: 5,90. Acidez volátil: 1,96.
				137	4,40	1,04	*Kloeckera apiculata.*			
				138	3,75	0,91	*Kloeckera apiculata.*			
			II	139	6,90	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				140	0,60	0,13	*Candida pulcherrima.*			
				141	3,75	0,78	*Kloeckera apiculata.*			
				142	3,75	0,78	*Kloeckera apiculata.*			
				143	4,40	0,58	*Kloeckera apiculata.*			
				144	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
			III	145	0,65	0,13	*Candida pulcherrima.*			
				146	8,75	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				147	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				148	9,40	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				149	9,40	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				150	6,90	0,19	*Zygosaccharomyces florentinus*			

CUADRO II

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
11	Arroes: 18 km. al este de Gijón.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	151	4,40	0,78	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finalizan *S. pastorianus* y *Kloeckera magna.*	Sidra San Pedro de Arroes (Arroes).	Alcohol: 5,40. Acidez volátil: 0,27.
			II	152	3,75	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
				153	3,75	0,91	*Kloeckera apiculata.*			
				154	3,75	0,84	*Kloeckera apiculata.*			
				155	3,15	0,65	*Candida pulcherrima.*			
				156	4,40	0,97	*Kloeckera apiculata.*			
				157	3,75	0,71	*Kloeckera apiculata.*			
			III	158	10,65	0,65	*Saccharomyces ellipsoideus*...			
				159	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				160	5,65	0,26	*Candida utilis.*			
				161	8,15	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				162	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				163	6,90	0,58	*Kloeckera magna*			
				164	5	1,16	*Kloeckera apiculata.*			
				165	9,40	0,32	*Saccharomyces pastorianus* .			

CUADRO 12

N.º de muestra.	Localidad de procedencia de las manzanas.	Substrato.	Fase fermentativa.	Cepas.	Poder fermentativo % en V.	Acidez volátil gramos/l.	DIAGNOSTICO	Curso de la fermentación.	Lugar en que se tomó la muestra.	Alcohol y acidez volátil de las sidras obtenidas a partir de las muestras.
12	Arroes: 18 km. al este de Gijón.	Manzana Encarnada, Prieta, Piñón, Chata, Fresnosa, Durón y Cristalina.	I	166	3,15	1,04	*Kloeckera apiculata.*	Inician la fermentación *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* y la finalizan *S. pastorianus*, *Torulaspora rosei* y *Zigosac. florentinus.*	Sidra Viuda de A. Buznego de Arroes.	Alcohol: 5,40. Acidez volátil: 0,38.
				167	3,75	0,91	*Kloeckera apiculata.*			
				168	3,15	0,91	*Kloeckera apiculata.*			
			II	169	0,65	0,13	*Candida pulcherrima.*			
				170	0,65	0,13	*Candida pulcherrima.*			
				171	3,75	0,26	*Candida pulcherrima.*			
				172	3,75	0,97	*Kloeckera apiculata.*			
				173	3,15	0,97	*Kloeckera apiculata.*			
			III	174	9,40	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ..			
				175	8,75	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				176	8,75	0,32	*Saccharomyces pastorianus* ..			
				177	9,40	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				178	8,75	0,26	*Saccharomyces pastorianus* ...			
				179	5	0,52	*Torulaspora rosei*			
				180	8,75	0,13	*Zigosaccharomyces florentinus*			

En el cuadro 13 se resumen los datos extraídos de los cuadros 1-12; en la primera línea aparecen los números progresivos del mosto analizado, y en las líneas que siguen se detallan las especies, indicando el número de cepas encontradas en cada mosto y el total de cepas encontradas de cada especie.

En el cuadro 14 se indica el número de cepas de las distintas especies blastomicéticas que se aislaron en cada una de las fases fermentativas. Se observa que a medida que se avanza en la fermentación van disminuyendo las cepas de especies no esporuladas y aumentan las esporuladas.

En el cuadro 15 se exponen los resultados teniendo en cuenta el número de mostos donde cada especie ha sido hallada, número de cepas aisladas de cada una de las especies, tanto por ciento de frecuencia y en relación con el número total de cepas obtenidas. Al final se incluyen cuatro columnas en las que se indican las cantidades mínimas y máximas de alcohol y acidez volátil producidas por las distintas cepas de cada especie.

Habiéndose observado que ninguna cepa tenía poder fermentativo superior a 10,65° a pesar de estar manejando especies que se caracterizan por su elevado poder fermentativo, se pensó que ello podría ser debido a la pobreza nitrogenada del mosto de manzana, procediéndose a la determinación de los mismos sobre mosto de uva. En el cuadro 16 se consignan los poderes fermentativos y acideces volátiles de diversas especies empleando como substratos mosto de uva y de manzana.

CUADRO 13

Número de cepas de las diversas especies en los doce mostos analizados.

MOSTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Kloeckera apiculata	8	5	7	10	6	4	6	7	8	6	7	5	79
Saccharomyces pastorianus	2	8	2	2	6	9	7	1	6	6	4	5	58
Candida pulcherrima	3	1	3	2	2	2	1	3	1	2	1	3	24
Kloeckera magna	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—	3
Saccharomyces fructuum ...	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Cryptococcus laurenti	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Saccharomyces chevalieri	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Candida mycoderma	—	—	2	—	—	—	1	—	—	—	—	—	3
Zigosaccharo florentinus ..	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	1	3
Saccharomyces ellipsoideus	—	—	—	—	1	—	—	2	—	—	1	—	4
Rhodotorula mucilaginosa	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
Candida utilis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
Torulaspora rosei	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
TOTAL DE CEPAS	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	180

CUADRO 14

Número de cepas de las diversas especies en cada fase fermentativa.

ESPECIES AISLADAS	Fase I	Fase II	Fase III
Kloeckera apiculata	38	28	13
Candida pulcherrima	14	9	1
Kloeckera magna	—	1	2
Cryptococcus laurentii	—	—	1
Candida mycoderma	1	—	2
Rhodotorula mucilaginosa	1	—	—
Candida utilis	—	1	—
Total de cepas no esporígenas...	54	39	19
Saccharomyces pastorianus	6	20	32
Saccharomyces fructuum	—	—	1
Saccharomyces chevalieri	—	—	1
Zigosaccharomyces florentinus	—	—	3
Saccharomyces ellipsoideus	—	1	3
Torulaspora rosei	—	—	1
Total de cepas esporígenas... ...	6	21	41
TOTAL DE CEPAS	60	60	60

CUADRO 15

Porcentaje de las cepas obtenidas; poderes fermentativos y acideces volátiles mínimos y máximos.

ESPECIES AISLADAS	Número de mostos en que se aisló la especie	Porcentaje	Número de cepas aisladas	Porcentaje	Producción de alcohol — % en volumen		Acidez volátil — % de ácido acético	
					Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
Kloeckera apiculata	12	100	79	43,88	3,15	5,65	0,45	1,36
Saccharomyces pastorianus	12	100	58	32,22	6,90	10,—	0,12	0,92
Candida pulcherrima	12	100	24	13,33	0,65	3,15	0,12	0,78
Saccharomyces ellipsoideus	3	25	4	2,22	9,40	10,65	0,32	0,65
Kloeckera magna	3	25	3	1,60	6,90	8,75	0,58	0,65
Zigosaccharomyces florentinus	3	25	3	1,60	6,90	8,75	0,13	0,42
Candida mycoderma	2	16,66	3	1,60	—	—	0,12	0,18
Candida utilis	1	8,33	1	0,55	5,65		0,26	
Rhodotorula mucilaginosa	1	8,33	1	0,55	—		0,45	
Cryptococcus laurenti	1	8,33	1	0,55	—		0,13	
Saccharomyces chevalieri	1	8,33	1	0,55	8,15		1,01	
Saccharomyces fructuum	1	8,33	1	0,55	7,50		0,41	
Torulaspora rosei	1	8,33	1	0,55	5,—		0,52	

CUADRO 16

Poderes fermentativos y acideces volátiles de algunas cepas de las especies aisladas.

Núm. de la cepa	ESPECIE	MOSTO DE MANZANA		MOSTO DE UVA	
		Poder fermentativo	Acidez volátil	Poder fermentativo	Acidez volátil
3	*Kloeckera apiculata*	5,65	0,54	5,65	1,23
135	*Kloeckera apiculata*	5,65	0,45	6,25	1,30
157	*Kloeckera apiculata*	3,75	0,71	3,75	1,42
34	*Sacch. pastorianus*	10	0,12	12,50	0,91
139	*Sacch. pastorianus*	6,90	0,26	8,75	0,97
38	*Candida pulcherrima*	3,15	0,18	3,75	0,18
40	*Candida pulcherrima*	1,25	0,18	1,25	0,18
79	*Candida pulcherrima*	3,15	0,19	3,15	0,18
9	*Kloeckera magna*	8,75	0,65	9,30	0,71
163	*Kloeckera magna*	6,90	0,58	6,90	0,65
11	*Saccharomyces fructuum* ..	7,50	0,41	9,30	0,41
29	*Cryptococcus laurenti*	—	0,13	—	0,12
43	*Saccharomyces chevalieri*	8,15	1,01	10	1,07
44	*Candida mycoderma*	—	0,18	—	0,18
109	*Rhodotorula mucilaginosa*	—	0,45	—	0,26
158	*Sacch. ellipsoideus*...	10,65	0,65	15	1,36
160	*Candida utilis*	5,65	0,26	6,25	0,26
179	*Torulaspora rosei*	5	0,52	5,65	0,59
180	*Zigo. florentinus*	8,75	0,13	9,30	0,19

CONCLUSIONES

Del examen detenido de los cuadros se deducen los siguientes hechos:

a) Las especies de levaduras que dominan en la fermentación de los mostos de manzana de Asturias, son: *Kloeckera apiculata, Saccharomyces pastorianus* y *Candida pulcherrima,* encontradas en las doce muestras examinadas y, por tanto, con el 100 % de frecuencia.

El número de cepas aisladas de *Kloeckera apiculata* fue particularmente elevado: 79; de *Saccharomyces pastorianus,* 58, y 24, de *Candida pulcherrima.*

b) Presentes en tres mostos (frecuencia del 25 %) se han hallado las especies: *Saccharomyces ellipsoideus, Kloeckera magna* y *Zygosaccharomyces florentinus.*

c) En sólo un mosto se encontraron: *Saccharomyces chevalieri, Sacch. fructuum, Torulaspora rosei, Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus laurentii;* en dos, la *Candida mycoderma.*

La presencia de estas especies en los mostos de manzana de Asturias puede ser considerada como un hecho de importancia secundaria bajo el punto de vista fermentativo, aunque la tengan desde el puramente biológico, ya que no son abundantes y, por tanto, no se pueden considerar como elementos activos en los cambios metabólicos que se originan durante el transcurso de la fermentación de los mismos.

d) Todos los cultivos aislados pertenecen a trece especies de levaduras, de las cuales seis son esporuladas y siete no esporuladas.

De los 180 cultivos, 112 (62,22 %) pertenecen a formas no esporuladas y 68 (37,78 %) a formas esporuladas. Los cultivos no esporulados pertenecen, en su mayor parte, a los géneros *Kloeckera* y *Candida.* Y los cultivos esporulados, en su mayoría, pertenecen al género *Saccharomyces.*

e) De la *Candida pulcherrina* se aislaron algunas cepas (38, 79, 114) que no coloreaban los cultivos de gelatina-mosto ni de agar-malta, cosa que verificaban la mayoría de las cepas, produciendo unas estrías rojizas muy típicas en los citados medios.

f) La mayor parte de las cepas de *Saccharomyces pastorianus* fermentan la galactosa a temperaturas bajas, mientras que a 26°-28° C. no

fermentan el citado azúcar. Esta particularidad ya fue observada con anterioridad por Capriotti en las cepas de dicha levadura aisladas en la zona vitivinícola italiana de Trento (20).

g) Se ha puesto en evidencia que en la primera fase de la fermentación espontánea de los mostos de manzana de Asturias dominan netamente las especies *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* (treinta y ocho cepas de la primera y catorce de la segunda). La frecuencia de estas dos especies de bajo poder fermentativo va disminuyendo a medida que avanza la fermentación del mosto, dominando en la fase final el *Saccharomyces pastorianus* (treinta y dos cepas), especie de elevado poder fermentativo; a ella se asocian en esta fase final otras especies de alto poder fermentativo.

h) Es interesante observar, en el cuadro general, que las sidras de más elevada riqueza alcohólica y más baja acidez volátil corresponden a las muestras en que aislaron mayor número de cepas de *Saccharomyces pastorianus,* demostrándose la gran importancia que esta levadura adquiere en la fermentación de la sidra.

i) Se ha puesto de manifiesto que algunas especies blastomicéticas producen mayor cantidad de alcohol cuando se utiliza el mosto de uva como substrato de fermentación, en vez del mosto de manzana; la diferencia es particularmente notoria en el caso de especies heterótrofas para algunos factores esenciales de crecimiento, como ocurre con el *Saccharomyces ellipsoideus.*

Agradecemos a D. José Martínez y D. Cipriano Díaz Foes la ayuda que nos han prestado para realizar la toma de muestras; asimismo agradecemos a los propietarios de Sidra Ornia, Sidra Ordóñez, Sidra Sánchez, Sidra El Sareganu, Sidra Miravalles, Sidra M. Busto, Sidra Riera, Sidra Busto Vega, Sidra San Pedro de Arroes y Sidra Vda. de A. Buznego las facilidades dadas para la toma de muestras.

SUMMARY

In this work we study the blastomycetic flora that takes part in the fermentation of the apple mosts in Asturias. We carried out the isolations in three phases: the first one, before the beginning of the fermentations, the second one six days after its beginning and the third one when the tumultuous fermentation had ceased, For each must we isolated 15 pure cultures of yeast and in the total of musts analysed 180 stoks which have been submitted to a detailed identification study: they belong to 13 blastomycetic species. Among these *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* prevail in the first phase of the fermentation and decrease in the following phase where *Saccharomyces pastorianus* increases and then is in clear predominance in the third phase.

BIBLIOGRAFIA

(1) Pasteur, L., Comp. Rend. Acad. Sci. 87, 813, 1878.
(2) Hansen, E., Medd. Carlsberg Lab. 1, 293, 1881.
(3) Hansen, E., Medd. Carlsberg Lab. 1, 381, 1882.
(4) Iñigo Leal, B., Revista de Ciencia Aplicada, 62, 1958.
(5) Kayser, E., Ann. Inst. Pasteur, 1890.
(6) Lloyd, F. J., Board of Agricult. and Fisheries, 1903.
(7) Barker, B. T. P., Ann. Rop. Long. Ashton Res. Station, 1904.
(8) Pearce, Elsie y Barker, B. T. P., Jour of Agric. Sci. III, 1908.
(9) Barker, B. T. P., Jour. of the Inst. of Brewing, XXVIII, 1922.
(10) Barker, B. T. P., Ann. Rop. Long. Ashton Res. Station, 1949.
(11) Barker, B. T. P., Ann. Rep. Long. Ashton Res. Station, 1950.
(12) De 'Rossi, G., IV Congr. Int. Vigne et Vin, Lausanne, 1935.
(13) Castelli, T., Nuovi Ann. dell'Agricol., 1939.
(14) Castelli, T., e Iñigo Leal, B., Ann. Fac. Agr. di Perugia, 1957.
(15) Castelli, T., e Iñigo Leal, B., Ann. Fac. Agr. di Perugia, 1957.
(16) Castelli, T., Att. VI Cong. Int. di Microbiologia, Roma, 1953.
(17) Vázquez, D., Mareca, I., y Garrido, J., Revista de Ciencia Aplicada, 63, 1958.
(18) Guilliermond, A., Les Levures, París, Octve Doin et fils, 1912.
(19) Lodder, J. y Kreger van Rij, The Yeasts, Amnsterdam, 1952.
(20) Capriotti, A., Atti Acc. Ital. Vite e Vino, 5, 1954.

LABORATORIOS ALTER
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

SOBRE UN NUEVO METODO DE TINCION DE BACILOS ESPORULADOS

POR

F. FERNANDEZ SANCHEZ

INTRODUCCION

Son muy escasas, en la literatura a nuestro alcance, las citas en que aparecen procedimientos de tinción que empleen Rojo congo.

En Técnica bacteriológica existen las llamadas tinciones negativas, de las cuales la más divulgada es el método de Burri, a la tinta china, usado para poner de manifiesto las espiroquetas (1). Algunos autores, como Beniau (2) y Hoffmann (3), utilizan Rojo congo en vez de tinta china. El primero se vale de una solución acuosa al dos por ciento, resultando una tinción negativa con fondo rojo; el segundo preconiza el uso de la solución al veinte por ciento, y una vez seca la extensión la trata con alcohol clorhídrico al uno por ciento, con lo que el fondo resulta azul en vez de rojo, no quedando en ningún caso teñidos los gérmenes. Nuestro método tiende a colorear el fondo y los bacilos, quedando en resaltado contraste negativo las esporas,

PARTE EXPERIMENTAL

El procedimiento propuesto es el siguiente: Sobre portaobjetos, perfectamente desengrasados y limpios (lo cual es indispensable), se efectúan las extensiones de la manera normal. Se fijan por el calor y una vez frías se extiende sobre las preparaciones Rojo congo en solución acuosa al dos por ciento; esto puede hacerse mediante el asa de platino o empleando un cubreobjetos. Hay que tener presente que no conviene

que la capa del colorante resulte excesivamente fina ni demasiado gruesa, lo cual se consigue fácilmente con la práctica. Efectuada esta operación, se deja secar al aire, y a continuación se cubren los portas con solución de Verde malaquita al cinco por ciento; se deja medio minuto y se lava con agua. Se cubre de nuevo, pero esta vez con Fucsina básica fenicada diluída, que deberá actuar durante un minuto. Por último, se lava otra vez con agua y se deja secar espontáneamente.

Como puede observarse en las microfotografías adjuntas (nos. 1 a 6), los bacilos aparecen con toda claridad y se ve que las esporas, que se destacan nítidamente, no se han coloreado. Los cuerpos bacilares quedan teñidos en rojo o en verde. Parece ser que los bacilos jóvenes se colorean en rojo, y los ya maduros, en verde. En la fotografía núm. 6 pueden verse bacilos vacíos que se muestran transparentes.

Este procedimiento de tinción puede aplicarse a cualquier clase de gérmenes, obteniéndose interesantes resultados. Aparte de los colorantes citados anteriormente, pueden utilizarse otras combinaciones (con Cristal violeta, Azul de metileno, etc.). De esto se darán detalles en otro trabajo que tenemos en preparación.

RESUMEN

Se describe un nuevo método de coloración aplicable a bacilos esporulados. La tinción, basada en tratar con Rojo congo y teñir posteriormente con Verde malaquita y Fucsina básica, es doble, afectando al fondo de la preparación y a los gérmenes. Por este procedimiento, las esporas no se colorean, destacándose con toda claridad.

SUMMARY

This paper describes a new method of coloration to be applied to sporulated bacilli. The dying based on a treatment with Congo red and posterior dying with Malachite green and basic Fuchsine, is double, affecting both the ground of the preparation and the germs. By this procedure the spores are not colorated and project out quite clearly.

BIBLIOGRAFIA

(1) Citado por SUÁREZ PEREGRÍN, E. Manual de análisis clínicos. 6.ª edic., página 150. Granada, 1953.

(2) Loc. cit.

(3) Citado por GRADWOHL, R. B. Clinical laboratory methods and diagnosis. 3.ª ed., pág. 2046. St. Louis, 1943.

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

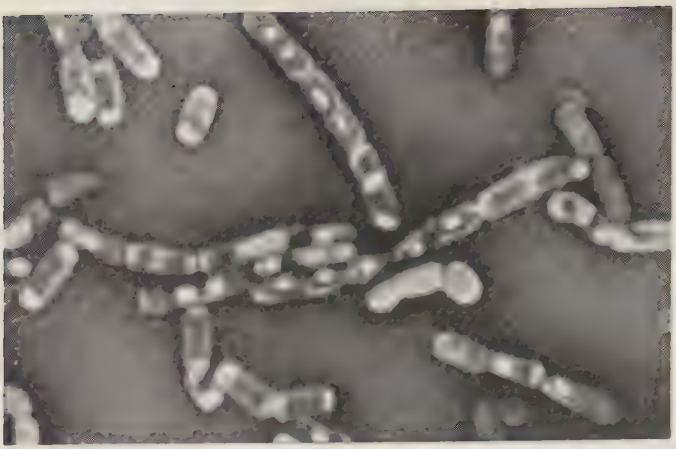


Foto 4

Foto 5

Foto 6.

Depósito legal, M. 702. 1958

Artes Gráficas REYES. - Jerónima Llorente, 15. - MADRID

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los "Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal". Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI".—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de "Aula Dei", Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. I, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

Ejemplar, 40 pesetas. Suscripción, 120 pesetas.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES".—Publicación del Instituto "Antonio J. de Cavanilles".

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto "José Celestino Mutis".

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis".

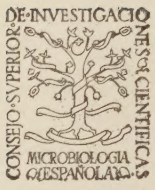
Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA